

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. September 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/090394 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/21,
C12P 13/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002689

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. März 2005 (14.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 013 847.8 20. März 2004 (20.03.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): DEGUSSA AG [DE/DE]; Bennigsenplatz 1, 40474
Düsseldorf (DE).

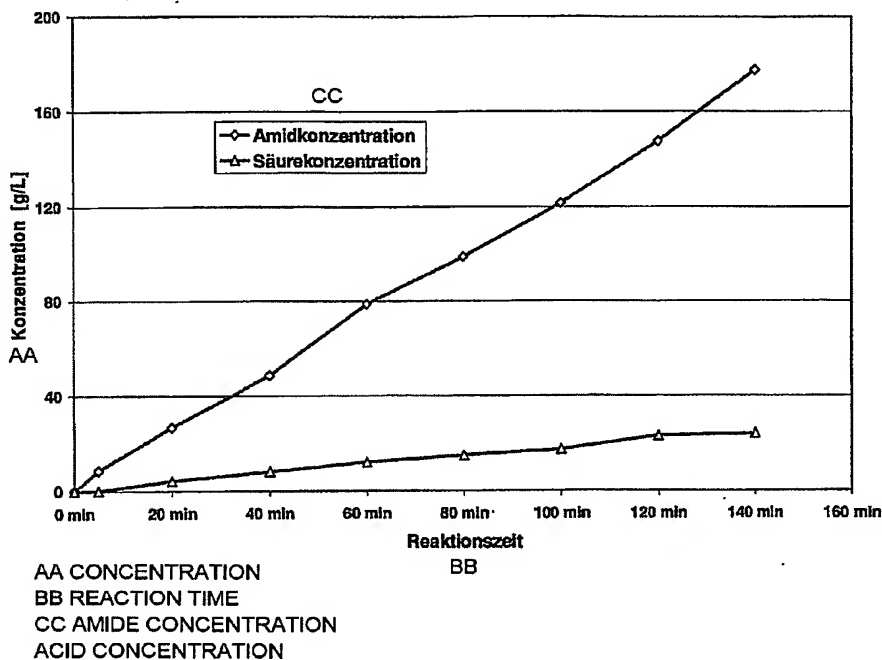
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OSSWALD, Stef-
fen [DE/DE]; Landwehrstrasse 33, 63517 Rodenbach
(DE). WECKBECKER, Christoph [DE/DE]; Au-
gust-Imhof-Strasse 25, 63584 Gründau (DE). HUTH-
MACHER, Klaus [DE/DE]; Lärchenweg 18, 63571
Gelnhausen (DE). GERASIMOVA, Tatijana [RU/RU];
Podolskih Kursantov, 18/1, fl. 626, Moscow, 117545 (RU).
NOVIKOV, Andrey [RU/RU]; Kransnopresnenskaya nab.,
1/2, fl. 107, Moscow, 123610 (RU). RYABCHENKO,
Ludmila [RU/RU]; Moscow region, Mozajskoe sh.,
113, Odintcovo, 14311 (RU). YANENKO, Alexander
[RU/RU]; Kutuzovsky pr., 33, fl. 135, Moscow, 12193
(RU). EGOROVA, Ksenia [RU/DE]; Beerentalweg 119,
21077 Hamburg (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CYANIDE TOLERANT NITRILHYDRATASES

(54) Bezeichnung: CYANIDTOLERANTE NITRILHYDRATASEN



(57) Abstract: The invention relates to cyanide tolerant nitrilhydratases produced from Pseudomonas genus microorganisms which exhibit a high cyanide tolerance. Said invention also relates to the use of said compounds for producing amides from nitriles in the presence of cyanides, polynucleotide sequences coding for said enzymes and said enzymes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/090394 A2



(74) **Gemeinsamer Vertreter:** DEGUSSA AG; Intellectual Property Management, PATENTE und MARKEN, Standort Hanau, Postfach 13 45, 63403 Hanau (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden und für diese Enzyme kodierende Polynukleotidsequenzen und diese Enzyme.

Cyanidtolerante Nitrilhydratasen

Die Erfindung betrifft cyanidtolerante Nitrilhydratasen insbesondere aus *Pseudomonas putida*- oder *Pseudomonas marginalis*- Stämmen, die eine erhöhte Cyanidtoleranz aufweisen, ihre Verwendung zur Herstellung von Amiden aus Nitrilen in Gegenwart von Cyaniden und für dieses Enzym kodierende Polynukleotidsequenzen.

Die Umsetzung von α -Hydroxynitrilen (Cyanhydrinen) und α -Aminonitrilen zu den entsprechenden Amiden mittels Nitrilhydratasen eröffnet eine neue Synthesever variante zu α -Hydroxysäuren und α -Aminosäuren, da α -Hydroxy- und α -Aminoamide auf einfache Weise verseift werden können (Process and catalysts for the production of methionine. Ponceblanc, Herve; Rossi, Jean-Christophe; Laval, Philip; Gros, Georges. (Rhône-Poulenc Animal Nutrition SA, Fr.), (WO 2001060789). Alternativ können α -Hydroxyamide auch mit Alkali- oder Erdalkalimetallhydroxiden zu den entsprechenden Salzen der Hydroxysäuren umgesetzt werden. Besonders bevorzugt ist hierbei die Umsetzung von 4-Methylthio- α -hydroxybutyramid (MHA-Amid) mit Calciumhydroxid, da Calcium-MHA direkt als alternative Produktform zu Methionin oder MHA als Futtermittelzusatz eingesetzt werden kann.

Allerdings zerfallen α -Hydroxynitrile und α -Aminonitrile leicht zu Aldehyden und Blausäure bzw. Aldehyden, Blausäure und Ammoniak. Die entstehende Blausäure ist ein starker Inhibitor für fast alle bekannten Nitrilhydratasen, mit Ausnahme der Nitrilhydratase aus *Rhodococcus equi* XL-1, die bei 20 mM Cyanid den bisher geringsten bekannten Aktivitätsverlust zeigt. (Production of amides from nitriles by *Rhodococcus equi* cells having a cyanide resistant-nitrile hydratase. Nagasawa, Tohru; Matsuyama, Akinobu. (Daicel Chemical Industries, Ltd., Japan), (EP 1 266 962 A).

Die geringe Produktivität von ca. 8 g Amid pro g Biotrockenmasse der Ruhezellen, die lange Reaktionszeit von 43 Stunden und die relativ geringe Produktkonzentration von 75 g/L führen zur Suche nach verbesserten Nitrilhydratasen.

- 5 Das Ziel der hier beschriebenen Erfindung ist deshalb einen Biokatalysator zur Verfügung zu stellen, der nicht diesen Einschränkungen unterliegt. Ausserdem ist eine noch höhere Toleranz des Biokatalysators gegenüber Cyanid vorteilhaft, da α -Hydroxynitrile und α -Aminonitrile zur Gewährleistung
10 einer schnellen und vollständigen Umsetzung des Aldehyds bevorzugt mit einem 1-3 %-igen Überschuss an Blausäure hergestellt werden, der zum Teil im Produkt verbleibt. Somit können während der Biotransformation Cyanidkonzentrationen auftreten, die 20 mM übersteigen.
15 Nebenprodukte und Reagentien wie als Hilfsbasen eingesetzte Amine dürfen die Nitrilhydratase-Aktivität ebenfalls nicht inhibieren.

- Aufgabe der Erfindung ist es, Nitrilhydratasen bereitzustellen, die gegenüber bei der Umsetzung von
20 Nitrilen zu Amiden in der Reaktionslösung vorhandenen Cyanidionen eine erhöhte Stabilität aufweisen.

- Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide, insbesondere aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren,
25 die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den in den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide, enthaltend die Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5 oder 7, 8, 10, zusammen jeweils die Aktivität einer cyanidtoleranten
30 Nitrilhydratase besitzen bzw. diese Nitrilhydratase bilden.

Bevorzugt stammen die Polynukleotide aus *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas marginalis*.

Gegenstand der Erfindung sind weiter Polynukleotide, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotide, enthaltend die oder bestehend aus den Nukleotidsequenzen aus den SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder dazu komplementären Nukleotidsequenzen,
 - b) Polynukleotide, enthaltend Nukleotidsequenzen, die den Sequenzen aus a) im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes entsprechen,
 - 10 c) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen gemäss a), die funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten,
 - d) Polynukleotide, die mit den komplementären Sequenzen aus a) oder c) unter stringenten Bedingungen hybridisieren,
- 15 wobei die Polynukleotide für eine cyanidtolerante Nitrilhydratase kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso die durch diese Polynukleotide kodierte Polypeptide mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5 oder 7, 8, 10 mit der Aktivität von
20 cyanidtoleranten Nitrilhydratase aus Mikroorganismen der Gattung Pseudomonas, die sowohl in den Mikroorganismen angereichert oder in isolierter Form vorliegen können. SEQ ID NO:2 und 7 kodieren für die alpha-Untereinheiten der Nitrilhydratase, SEQ ID NO:3 und 8 für die beta-
25 Untereinheiten der Nitrilhydratase und SEQ ID NO:5 und 10 für Aktivatorproteine deren Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704)

30 Erfindungsgemäß werden bevorzugt Wirtszellen verwendet, die durch die erfindungsgemäßen Polynukleotide transformiert oder transfektiert wurden.

Die Wirtszellen können zu den Eukaryonten oder Prokaryonten zählen, für die ein stabiles Expressionssystem bekannt ist, insbesondere

Als Host-Organismus dienen bevorzugt Mikroorganismen, für
5 Expressionssysteme gibt, wie z. B. *Pseudomonas*, *Pichia*, verschiedene Hefen, *Saccaromyces*, *Aspergillus* oder der Familie *Streptomyces*, insbesondere *E. coli*. Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* sind ebenso geeignet.

10 Vektor DNA kann in eukaryonische oder prokaryonische Zellen durch bekannte Transformations- oder Transfektionstechniken eingeführt werden.

„Transformation“, „Transfektion“, „Konjugation“ und „Transduktion“ beziehen sich auf nach dem Stand der
15 Techniken bekannten Maßnahmen, um fremde DNA einzuführen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank von *Pseudomonas marginalis*
20 oder *Pseudomonas putida*, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenzen der erfindungsgemäßen Polynukleotide aus der SEQ ID No:1, 4 oder 6, 9 oder Fragmente davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

25 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren, oder um solche
30 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenzen mit denen der erfindungsgemäßen Gene aufweisen. Sie können ebenso als Sonde auf sogenannte „arrays“, „micro arrays“

oder "DNA chips" aufgebracht werden, um die entsprechenden Polynukleotide oder hiervon abgeleitete Sequenzen wie z.B. RNA oder cDNA zu detektieren und zu bestimmen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
5 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide,
10 enthalten mindestens 25 oder 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge
15 von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf
20 Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen Polynukleotide gemäß SEQ ID No:1, 4, 6, 9 oder darin enthaltene Fragmente
25 und auch solche ein, die zu wenigstens 90 %, 93 %, 95 %, 97 % oder 99% identisch sind mit den Polynukleotiden gemäß SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder darin enthaltenen Fragmenten.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
30 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen Polypeptide gemäß den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 , und auch solche

ein, die zu wenigstens 90%, und besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit den Polypeptiden gemäß den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10.

- 5 Die aus der gewünschten Genbank erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler
10 (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- Kodierende DNA-Sequenzen, die sich den in aus SEQ ID No. 1, 4, 6, 9 enthaltenen Sequenzen durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der
15 Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit diesen Sequenzen oder Teilen von davon hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen
20 Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen
25 Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der
30 Genetik und Molekularbiologie.

- Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter
35 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus

SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, insbesondere von 20, 30 oder 40.

- 5 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.
- 10 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 90%
- 15 identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ
- 20 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

- Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
- 25 eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
- 30 durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
- 35 gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x

- SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere
- 5 Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).
- 10 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer
- 15 Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

- Im allgemeinen geht man so vor, dass man ein gut exprimierbares Gen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl, Gene mit schwächerer Expressionsleistung auf einem Vektor mit höherer Kopienzahl und/oder starkem
- 20 Promotor kloniert. Die Wirtszellen sind mit diesen Vektoren in der Weise transformiert, dass sie im Vergleich zum Startorganismus mindestens jeweils eine zusätzliche Kopie der für die Bildung von Nitrilhydratase kodierenden Nukleotidsequenzen enthalten.
- 25 Die so hergestellten transformierten oder rekombinanten Mikroorganismen insbesondere der Gattung Pseudomonas sind ebenfalls Teil der Erfindung.

- Es wurde gefunden, dass die Verstärkung der für die erfindungsgemäße Nitrilhydratase und das Helferprotein P47K
- 30 kodierenden Gene in Mikroorganismen zu einer erhöhten Produktion der Nitrilhydratase oder auch zu einer erhöhten Aktivität der Nitrilhydratase führen.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert, im Vergleich zum nicht rekombinierten Startorganismus.

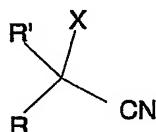
- 10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.
- 20 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso

- 1) ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
- 30 a) Umsetzung einer (eine) Nitrilgruppe(n) enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym, das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und

- b) Abtrennung des gebildeten Amids, wobei man
- c) für die Umsetzung des Nitrils zum Amid eine erfindungsgemäße Nitrilhydratase einsetzt. Deren Restaktivität beträgt nach der Umsetzung von Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM = mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. bevorzugt mindestens 90 % der Restaktivität desselben Enzyms, wenn dieses das unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cyanidionen für die Umsetzung eingesetzt wurde.
- 2) ein Verfahren gemäß 1), dadurch gekennzeichnet, dass die Restaktivität nach der Umsetzung in Gegenwart von 50 mM Cyanidionen mindestens 60 % beträgt,
- 3) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch gekennzeichnet, dass man das Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen oder deren Lysat einsetzt.
- 4) ein Verfahren gemäß 3), dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt,
- 5) ein Verfahren gemäß 1) oder 2), dadurch gekennzeichnet, dass man das gereinigte Enzym einsetzt,
- 6) ein Verfahren gemäß 1) bis 5), dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt, insbesondere *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas marginalis*,
- 7) ein Verfahren gemäß 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276, und die Aminosäuresequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 aufweisen,

- 8) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 7), dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formeln



5

(I)

 $\text{R}''\text{-CN}$

(II)

in der bedeuten:

X: OH, H, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen, NH_2

- 10 R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH_2 -substituiert
- ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder
- 15 unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-Atomen,
- mit Alkylthiogruppen substituierte Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C_1 bis C_3 -Rest
- 20 und Alkylen einem zweiwertigen C_3 bis C_8 -Rest entspricht,

R' : H, wenn R kein H bedeutet, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,

- 25 R'' : ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6 bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls substituiert mit einer oder zwei Alkylgruppen ($\text{C}_1 - \text{C}_3$), Cl, BR, F substituiert,
- einwertiger Alkylnitrilrest mit 1 bis 6 C-Atomen zu den entsprechenden Amiden umgesetzt,

- 30 9) ein Verfahren gemäß 8), dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel(I) in

Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure umgesetzt,

- 10) ein Verfahren gemäß 9), dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Gegenwart von 0,1 mol% Cyanid bis
5 3 mol% Cyanid bezogen auf das eingesetzte Nitril durchführt, bevorzugt > 2 bis 3 mol%. Dies entspricht bei 1 mol Endkonzentration bei 3 mol% 30 mMol Cyanid,
- 11) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril
10 Methioninnitril einsetzt,
- 12) ein Verfahren gemäß einem oder mehreren der Punkte 1) bis 10), dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt.
- Bevorzugt setzt man ein Reaktionsgemisch ein, wie man es erhält, wenn man Blausäure, 3-Methylthiopropionaldehyd in Gegenwart einer Hilfsbase wie z.B. Triethylamin nach dem Stand der Technik
15 umsetzt.
- Es kann vorteilhaft ohne Aufreinigung eingesetzt werden.
20
- Dies weist auf die zusätzliche Stabilität der erfindungsgemäßen Enzyme gegenüber Aldehyden und Aminen hin.
- 13) Ein Verfahren, bei dem man als Vorstufe für
25 Methacrylamid 2-Hydroxy-2-methylpropionitril, einsetzt.
- 14) Die Erfindung ist ebenso ausgerichtet auf isolierte und gereinigte Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den Nummern DSM 16275
30 (MA32, *Pseudomonas marginalis*) und DSM 16276 (MA113, *Pseudomonas putida*), und

- 15) Cyanidtolerante Nitrilhydratasen, isoliert aus den
Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, insbesondere aus den
unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276 hinterlegten
Stämmen von *Pseudomonas putida* und *Pseudomonas*
5 *marginalis*.

Die Hinterlegung erfolgte am 09.03.2004 bei der DSMZ,
Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in
Braunschweig, nach dem Budapester Vertrag.

- 10 Diese Stämme sind besonders geeignet, die erfindungsgemäßen
Enzyme zu produzieren.

„Isolierte und gereinigte Mikroorganismen“ betrifft
Mikroorganismen, die in einer höheren Konzentration als
natürlich zu finden vorliegen.

- 15 Gegenstand der Erfindung ist ebenso ein Verfahren zur
Herstellung der oben beschriebenen cyanidtoleranten
Nitrilhydratase, bei dem man

- a) einen diese Nitrilhydratase produzierenden
Mikroorganismus, insbesondere der Gattung *Pseudomonas*
marginalis oder *Pseudomonas putida*, unter Bedingungen
20 fermentiert, bei denen sich das Enzym in dem
Mikroorganismus bildet, und
- b) frühestens nach dem Durchlaufen der logarithmischen
Wachstumsphase die Zellen erntet.

Anschließend setzt man

- 25 a) entweder den das Enzym enthaltenden Mikroorganismus als
in Form von ruhenden Zellen, gegebenenfalls nach der
Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran oder
- b) das Lysat der Zellen oder
- c) das aus den Zellen des Mikroorganismus mit bekannten
30 Maßnahmen isolierte Enzym

zur erfindungsgemäßen Umwandlung von Nitrilen in Amide ein.

Bei der Nitrilhydratase kann es sich sowohl um ein mit nicht rekombinanten Mikroorganismen erzeugtes als auch um ein rekombinant erzeugtes Enzym handeln.

- 5 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide, wobei man einen diese Polypeptide produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der zugehörigen Polynukleotide induziert und
10 die Enzyme gegebenenfalls aus der Kultur isoliert.

Es handelt sich im allgemeinen um ein Verfahren, bei dem man

- a) Mikroorganismen insbesondere der Gattungen *Pseudomonas marginalis* oder *Pseudomonas putida* fermentiert, in
15 denen man isolierte Polynukleotide aus Mikroorganismus der Familie *Pseudomonas*, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den Sequenzen in den SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10 enthaltenden
20 Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide jeweils gemeinsam die Aktivität einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase besitzen, verstärkt, insbesondere rekombinant überexprimiert,
- b) aus diesen Mikroorganismen das Enzym mit
25 Nitrilhydrataseaktivität gegebenenfalls isoliert oder eine dieses Enzym enthaltende Proteinfraction herstellt, und
- c) die Mikroorganismus gemäss a) oder das Enzym gemäss oder die dieses enthaltende Fraktion b) in ein Medium
30 überführt, das ein Nitrilgruppen-haltige Verbindung der allgemeinen Formeln (I) und (II) enthält.

Das zur Fermentation verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for
5 General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.
- 10 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.
- 15 Als Stickstoffquelle können vorteilhaft organische Nitrile oder Säureamide wie Acetonitril, Acetamid, Methacrylnitrile, Methacrylamid, Isobutyronitril, Isobutyramid oder Harnstoff auch in Kombination mit anderen Stickstoffhaltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt,
- 20 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung
- 25 verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten
- 30 wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen

Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- 5 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder
- 10 Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 10°C bis 40°C und vorzugsweise bei 10°C bis 30°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sie die logarithmische Wachstumsphase durchschritten hat. Dieses
- 15 Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 70 Stunden erreicht. Im Anschluss daran werden die Zellen bevorzugt geerntet, gewaschen und in einem Puffer als Suspension bei einem pH-Wert von 6-9, insbesondere von 6,8 bis 7,9 aufgenommen. Die Zellkonzentration beläuft sich auf
- 20 1-25%, insbesondere 1,5 bis 15% (Feuchtgewicht/v). Die Permeabilität kann mit physikalischen oder chemischen Methoden so, z. B. mit Toluol wie bei Wilms et al., J. Biotechnol., Vol. 86 (2001), 19-30 beschrieben, erhöht werden, dass das umzuwandelnde Nitril die Zellwand
- 25 durchdringen und das Amid austreten kann.

Folgende Nitrile werden bevorzugt umgesetzt:

gesättigte Mononitrile:

Acetonitril, Propionitril, Butyronitril, Isobutyronitril, Valeronitril, Isovaleronitril, Capronitril

- 30 gesättigte Dinitrile:

Malonitril, Succinonitril, Glutaronitril, Adiponitril

aromatische unsubstituierte und substituierte Mono- und Dinitrile:

Benzonitril, 2,6-Difluorbenzonitril, Phthalonitril,
Isophthalonitril, Terephthalonitril,

α -Aminonitrile:

- 5 α -Aminopropionitril, α -Aminomethylthiobutyronitril, α -
Aminobutyronitril, Aminoacetonitril, alle von natürlichen
Aminosäuren abgeleitete Nitrile, α -Amino-3,3-
dimethylpropionitril α -Amino-2,3-dimethylpropionitril

Nitrile mit Carboxyl-Gruppen:

Cyanessigsäure

- 10 β -Aminonitrile:
Amino-3-propionitril

ungesättigte Nitrile:

Acrylnitril, Methacrylonitril, Allylcyanid, Crotononitril

α -Hydroxynitrile:

- 15 α -Hydroxy-n-propionitril, α -Hydroxy-n-butyronitril, α -
Hydroxy-isobutyronitril, α -Hydroxy-n-hexanonitril, α -
Hydroxy-n-heptanonitril, α -hydroxy-n-octanonitril, α , γ -
Dihydroxy- β , β -dimethylbutyronitril, Acroleincyanohydrin,
Methacrylaldehyd cyanohydrin, 3-Chlorolactonitril, 4-
20 Methylthio- α -hydroxybutyronitril und α -Hydroxy-
phenylpropionitril.

Die Konzentration der umzusetzenden Nitrile in der
Reaktionslösung ist nicht auf bestimmte Bereiche begrenzt.

- Um eine Inhibierung der Enzymaktivität durch das Substrat
25 zu vermeiden, hält man die Konzentration des Nitrils im
allgemeinen auf 0,02 bis 10 w/w%, insbesondere 0,1 bis
2 w/w%, bezogen auf die Menge des Biokatalysators als
getrocknete Zellmasse. Das Substrat kann zu Beginn der
Umsetzung insgesamt oder im Verlauf der Umsetzung
30 kontinuierlich oder diskontinuierlich zugesetzt werden.

Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgt mit dem Moisture Analyser MA 45 (Sartorius).

Wenn die Löslichkeit der Nitrilverbindung in dem wässrigen Reaktionssystem zu gering ist, kann ein Lösungsvermittler
5 zugesetzt werden.

Die Reaktion kann aber alternativ auch in einem Zweiphasensystem Wasser/organische Lösungsmittel durchgeführt werden.

Bei der Verwendung von Zellen des Mikroorganismus als
10 enzymatisch aktivem Material, ist die Menge der eingesetzten Zellen im Verhältnis zur Substratmenge bevorzugt 0,02 bis 10 w/w% als getrocknete Zellmasse.

Es ist auch möglich, das isolierte Enzym nach allgemein bekannten Techniken zu immobilisieren und in dieser Form
15 dann einzusetzen.

Die Reaktion wird im allgemeinen bei Temperaturen von -5°C bis 50°C, insbesondere 0°C bis 30°C, und einer Zeitdauer von 0,1 bis 100 Stunden durchgeführt.

Der einzuhaltende pH-Wert des Reaktionsgemisches ist so
20 lange nicht auf bestimmte Werte begrenzt, wie die enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Nach der Umsetzung kann das gebildete Amid aus der Reaktionslösung wie bekannt abgetrennt und gereinigt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren, bei
25 dem man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung zum Beispiel von den Zellen der Biomasse abtrennt und das Amid entweder zu der entsprechenden Säure verseift oder unter Zusatz von Alkali- oder Erdalkalimetallyhydroxiden zu den entsprechenden Salzen der Säuren umsetzt. Bevorzugt wird
30 MHA-Amid mit Calciumhydroxid verseift und das entsprechende Calciumsalz isoliert.

Beispiele

Beispiel 1

Anzuchtbedingungen

- Die Vorkulturen wurden innerhalb von 24 h unter Schütteln
 5 bei 30°C in einem Volumen von 5 ml in Glasröhrchen
 angezogen. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml der
 Hautkultur angeimpft und 42 h bei 25°C in einem
 Erlenmeyerkolben mit einem Gesamtvolumen von 1000 ml
 geschüttelt.

| Medium für die Vorkultur (pH 7,0) | |
|--|-------------|
| K ₂ HPO ₄ | 7 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| Na-citrat | 0,5 g |
| Glycerin | 2 g |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,004 g |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0.1 g |
| Acetamid | 2 g |
| Spurensalzlösung | 0,1 ml |
| Demineralisiertes Wasser | Ad. 1000 ml |

10

| Medium für die Hauptkultur (pH 7,0) | |
|--|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 7 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| Natriumcitrat | 0,5 g |
| Glycerin | 2 g |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,004 g |

| | |
|--|-------------|
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0.1 g |
| Acetamid | 10 g |
| Spurensalzlösung | 0,1 ml |
| Demineralisiertes Wasser | Ad. 1000 ml |

| | |
|---|-------------|
| Spurensalzlösung | |
| EDTA, Na ₂ * 2 H ₂ O | 158 mg |
| Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O | 4,7 mg |
| ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 70 mg |
| MnSO ₄ * 4 H ₂ O | 18 mg |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 16 mg |
| CuSO ₄ * 5 H ₂ O | 4,7 mg |
| CoSO ₄ * 6 H ₂ O | 5,2 mg |
| Demineralisiertes Wasser | Ad. 1000 ml |

Beispiel 2

Isolierung und Identifizierung der Mikroorganismen

- 5 Die beiden Stämme MA32 und MA113 wurden durch Bestimmung der Nitrilhydratase-Aktivität der Ruhezellen in Gegenwart von 2 mM Kaliumcyanid selektiert.

Eigenschaften von MA32:

| | | |
|----|----------|--------------|
| | Zellform | Stäbchen |
| 10 | Breite | 0,6 - 0,8 µm |
| | Länge | 1,5 - 3,0 µm |

| | | |
|----|---|-----------|
| | Beweglichkeit | + |
| | Geißeln | polar > 1 |
| 5 | Gram-Reaktion | - |
| | Lyse durch 3% KOH | + |
| | Aminopeptidase (Cerny) | + |
| | Oxidase | + |
| | Katalase | + |
| 10 | Wachstum bei 41°C | - |
| | Substratverwertung | |
| | Adipat | - |
| 15 | Citrat | + |
| | Malat | + |
| | Phenylacetat | - |
| | D-Glucose | + |
| | Maltose | - |
| 20 | Mannitol | + |
| | Arabinose | + |
| | Mannose | + |
| | Trehalose | + |
| | Sorbitol | + |
| 25 | Erythrol | + |
| | Citraconat | + |
| | Inositol | + |
| | ADH | + |
| 30 | Urease | - |
| | Hydrolyse von Gelatine | + |
| | Hydrolyse von Esculin | + |
| 35 | Levan aus Saccharose | + |
| | Denitrification | + |
| | Lecithinase | + |
| 40 | Fluoreszens | + |
| | Pyocyanin | - |
| 45 | Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden | |
| | Die Analyse eines 484 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von <i>Pseudomonas marginalis</i> | |

Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA32 als *Pseudomonas marginalis* identifiziert werden.

5 Eigenschaften von MA113:

| | | |
|----|------------------------|--------------|
| | Zellform | Stäbchen |
| | Breite | 0,6 - 0,8 µm |
| | Länge | 1,5 - 3,0 µm |
| 10 | Beweglichkeit | + |
| | Geißeln | polar > 1 |
| | Gram-Reaktion | - |
| | Lyse durch 3% KOH | + |
| 15 | Aminopeptidase (Cerny) | + |
| | Oxidase | + |
| | Katalase | + |
| | Wachstum bei 41°C | - |
| 20 | Substratverwertung | |
| | Adipat | - |
| | Citrat | + |
| | Malat | + |
| 25 | Phenylacetat | + |
| | D-Glucose | + |
| | Maltose | - |
| | Mannitol | - |
| | Arabinose | - |
| 30 | Mannose | - |
| | Trehalose | - |
| | Inositol | - |
| | β-Alanin | + |
| | α-Ketoglutarat | + |
| 35 | Benzylamin | + |
| | Hippurat | + |
| | Azelat | + |
| | D-Mandelat | + |
| 40 | ADH | + |
| | Urease | - |
| | Hydrolyse von Gelatine | - |
| | Hydrolyse von Esculin | - |
| 45 | Levan aus Saccharose | - |

| | | |
|---|-----------------|---|
| | Denitrification | - |
| | Lecithinase | - |
| 5 | Fluoreszens | + |
| | Pyocyanin | - |

10 Das Profil der zellulären Fettsäuren ist typisch für die Gruppe I der Pseudomonaden

15 Die Analyse eines 476 bp langen Abschnitts der 16S rRNA ergab eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Sequenz von *Pseudomonas putida*

Unter Berücksichtigung aller Daten konnte MA113 als *Pseudomonas putida* identifiziert werden.

Beispiel 3

20 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen, durch Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt und im Standardpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5) resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden zu 700 µl
25 des Standardpuffers gegeben und zum Starten der Reaktion mit 250 µl einer 200 mM Lösung des Nitrils in Standardpuffer versetzt. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril nach 10 min bei 20°C zu 5-30 % umgesetzt war. Nach 10 min
30 bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und die Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt.

| | |
|---------------|---|
| HPLC-Analytik | |
| Säule | Intersil ODS-3V (GL Sciences Inc.) |
| Mobile Phase | Gemisch aus 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,3 und Acetonitril im Verhältnis 85:15 für Methioninnitril, MHA-Nitril und Acetoncyanhydrin bzw. 99:1 für alle anderen Substrate |
| Flußrate | 1 ml/min |
| Detektion | UV bei 200 nm |

Die Aktivität von einem U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Methacrylnitril in einer Minute zum Amid umsetzt. Entstand neben dem Amid auch die Säure, wurde ein

5 U definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Methacrylnitril in einer Minute zu Amid und Säure umsetzt.

In Abbildung 1 und in Abbildung 2 werden die relative Aktivitäten der Stämme MA32 und MA113 dargestellt.

Beispiel 4

10 Einfluß von Cyanid auf die Aktivität der Nitrilhydratase

50 µl einer analog zu Beispiel 3 hergestellten Zellsuspension wurden zu 700 µl des Standardpuffers gegeben, der 0; 21,4; 53,6 und 107,1 mM Kaliumcyanid enthielt (Endkonzentration 0, 20, 50, 100 mM Cyanid. Zum

15 starten der Reaktion wurden 200 µl einer 200 mM Lösung des Nitrils im Standardpuffer zugesetzt, der jeweils die selbe Cyanidkonzentration aufwies wie die übrige Reaktionslösung. Die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension war hierbei so bemessen, daß das Nitril im Ansatz ohne Cyanid

20 nach 10 min bei 20°C zu 16 % umgesetzt war. Nach 10 min bei 20°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl halbkonzentrierter Phosphorsäure abgestoppt und der Umsatz wurde analog zu Beispiel 2 bestimmt.

In Abbildung 3 und in Abbildung 4 werden die relativen Aktivitäten für die Umsetzung von Methacrylnitril in Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration wiedergegeben.

Beispiel 5

- 5 Umsetzung von Acetoncyanhydrin mit *Pseudomonas marginalis* MA32 Ruhezellen

Pseudomonas marginalis MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 1,16 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 50 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Frisch destilliertes Acetoncyanhydrin wurde bei 4°C unter heftigem Rühren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 5 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 7,5 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Nach 140 min waren 10,0 g des Nitrils vollständig zu 10,7 g Amid und 1,4 g Säure umgesetzt worden.

In Abbildung 5 wird der mit dem Stamm MA113 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

Beispiel 6

- Umsetzung von rohem MHA-Nitril mit *Pseudomonas marginalis* MA32 Ruhezellen

Pseudomonas marginalis MA32 Zellen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben angezogen und abzentrifugiert. Eine solche Menge der Zellen, die 0,34 g Biotrockenmasse enthielt, wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 auf ein Endvolumen von 70 ml verdünnt. Zusätzlich wurden dem Reaktionsgemisch 0,02 mM 2-Methyl-1-propanboronsäure zugesetzt. Das rohe MHA-Nitril wurde bei 4°C unter heftigem

Rühren kontinuierlich mit einer solchen Rate zugegeben, daß die Konzentration während der Reaktion 10 g/L zu keinem Zeitpunkt überschritt. Der pH wurde konstant bei 8,0 gehalten. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC wie in
5 Beispiel 2 beschrieben durchgeführt. Nach 510 min waren 10,05 g des Nitrils vollständig zu 11,13 g Amid und 0,31 g Säure umgesetzt worden. Das entspricht einer Endkonzentration von 139 g Amid pro Liter.

Das MHA-Nitril war direkt aus 3-Methylthiopropionaldehyd
10 und einem leichten Überschuss an Blausäure hergestellt worden. Eine 50 mM Lösung dieses MHA-Nitrils in Wasser enthielt 0,5 mM Cyanid (Spektroquant®, Merck).

In Abbildung 6 wird der mit dem Stamm MA32 erzielte zeitliche Reaktionsablauf dargestellt.

15 Beispiel 7

Klonierung des Nitrilhydratase-Gen-clusters aus *Pseudomonas marginalis* MA 32 und Konstruktion eines Expressionsvektors

Der Gen-Cluster der Nitrilhydratase enthaltend eine α -Untereinheit, β -Untereinheit und einem Nitrilhydratase-
20 Aktivatorprotein, dessen Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), wurde mit den Primern 1F und 1R per PCR amplifiziert, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme NdeI und HindIII einfügten. Das
25 so erhaltene PCR-Produkt wurde in einen mit NdeI und HindIII geschnittene Vektor ligiert, bei dem die eingefügten Gene unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors stehen. Der so entstandene Expressionsvektor heißt pKE31.

Die Restriktionskarte findet sich in Abbildung 7, die
30 Sequenz unter SEQ ID NO:1.

Das Expressionsplasmid wurde in den Stamm *E. coli* DSM 14459 transformiert, der bei der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) am 22.08.2001 hinterlegt worden ist.

Primer:

| | |
|----|--|
| 1F | 5'-CTC CAC CAT ATG AGT ACA GCT ACT TCA ACG -3' |
| 1R | 5'-CTT CAT AAG CTT CTA TCT CGG ATC AAA TGG-3' |

- 5 1F: SEQ ID NO:11
1R: SEQ ID NO:12

Die Gene befinden sich auf den Abschnitten von SEQ ID NO:1:

- Gen der α -Untereinheit: nt 25-609
Gen der β -Untereinheit: nt 650-1312
10 Gen des Aktivatorproteins: nt 1309-2577

Beispiel 8

Klonierung des Nitrilhydratase-Gen-clusters aus *Pseudomonas putida* MA113

- Der Gen-Cluster der Nitrilhydratase bestehend aus α -
15 Untereinheit, β -Untereinheit und einem Nitrilhydratase-Aktivatorprotein, dessen Co-Expression für die Aktivität der Nitrilhydratase essentiell ist (Nojiri et al., 1999, Journal of Biochemistry, 125:696-704), wurde mit den Primern 1F und 1R per PCR amplifiziert.

- 20 Die Sequenz findet sich unter SEQ ID NO:6.

Primer:

| | |
|----|---|
| 2F | 5'-ATG ACG GCA ACT TCA ACC CCT GGT G-3' |
| 2R | 5'-TCA GCT CCT GTC GGC AGT CG-3' |

2F:SEQ ID NO:13

2R:SEQ ID NO:14

Die Gene befinden sich auf den Abschnitten von SEQ ID NO:5:

| | | | |
|---|---------------------------------|----|-----------|
| | Gen der α -Untereinheit: | nt | 1-582 |
| 5 | Gen der β -Untereinheit: | nt | 624-1286 |
| | Gen des Aktivatorproteins: | nt | 1283-2360 |

Beispiel 9

Heterologe Expression der Nitrilhydratasen aus *Pseudomonas marginalis* MA 32 in *E. coli* DSM 14459

10 *E. coli* DSM 14459 wurde im Zusammenhang mit der DE 101 55 928 hinterlegt.

Die mit pKE31 transformierten Zellen wurden in LB-Medium (LB Bouillon nach Miller, VWR), das 2 mM Eisen(III)-Citrat und 100 µg/ml Ampicillin enthielt, unter Schütteln bei 37°C
15 angezogen. Nach 12 - 16 Stunden wurde eine solche Menge der Vorkultur in eine Hauptkultur überimpft, dass diese eine OD600 von 0,1 aufwies. Das Kulturmedium der Hauptkultur entsprach dem der Vorkultur, enthielt aber zusätzlich 2 g/L L-Rhamnose. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 22 stündiger
20 Kultivierung bei 30°C.

Beispiel 10

Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten

Die Anzucht der Zellen und die Bestimmung der Aktivität wurden wie in Beispiel 9 und Beispiel 3 beschrieben
25 durchgeführt.

Die mit dem Plasmid pKE31 transformierten Zellen des Stamms *E. coli* DSM 14459 wiesen eine spezifische Aktivität von 17 U/mg BTM auf.

Beispiel 11

Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten in Gegenwart von 100 mM Kaliumcyanid

Die Anzucht der Zellen und die Bestimmung der Aktivitäten
5 in Gegenwart von 100 mM Kaliumcyanid wurden wie in Beispiel 9 und Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.


Die mit dem Plasmid pKE31 transformierten Zellen des Stamms E. coli DSM 14459 wiesen eine spezifische Aktivität von 11 U/mg BTM auf.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Projekthaus Biotechnologie
Rodenbacher Chaussee
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE


| | |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS | |
| Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: JMI09 (deltarhab) | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 14459 |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAKONOMISCHE BEZEICHNUNG | |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <div style="margin-left: 40px;"> <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung </div> eingereicht. (Zusätzliches ankreuzen). | |
| III. EINGANG UND ANNAHME | |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-08-22 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist. | |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG | |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am <input type="checkbox"/> eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am <input type="checkbox"/> eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ernächtigten Bediensteten: <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">  </div> Datum: 2001-08-24 |

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Projekthaus Biotechnologie
Rodenbacher Chaussee
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

| | |
|--|--|
| I. HINTERLEGER | II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS |
| Name: Degussa AG Projekthaus Biotechnologie Anschrift: Rodenbacher Chaussee 63457 Hanau | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14459 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 2001-08-22 |
| III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG | |
| Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2001-08-22 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig | |
| IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ² | |
| | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-08-24 |

¹ Angabe des Datums der Erstintherlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.


³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben benannt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

| | |
|--|--|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS | |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: MA32 | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16275 |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG | |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen). | |
| III. EINGANG UND ANNAHME | |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an; der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist. | |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG | |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2004-03-09 |

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE


| | | | |
|---|--|---|--|
| I. HINTERLEGER | | II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS | |
| Name: Degussa AG Service Center Biokatalyse Anschrift: Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau | | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16275 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2004-03-04 | |
| III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG | | | |
| Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2004-03-08 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (x) ³ lebensfähig (.) ³ nicht mehr lebensfähig | | | |
| IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST⁴ | | | |
| | | | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | | | |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: V. Wehlo Datum: 2004-03-09 | |

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
Service Center Biokatalyse
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE


| | |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS | |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: MA113 | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16276 |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG | |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen). | |
| III. EINGANG UND ANNAHME | |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2004-03-04 (Datum der Erst- hinterlegung) ¹ eingegangen ist. | |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG | |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am 2004-03-04 eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am 2004-03-04 eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2004-03-09 |

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Degussa AG
 Service Center Biokatalyse
 Rodenbacher Chaussee 4
 63457 Hanau

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
 ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
 INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

| | |
|--|--|
| I. HINTERLEGER | II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS |
| Name: Degussa AG Service Center Biokatalyse Anschrift: Rodenbacher Chaussee 4 63457 Hanau | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 16276 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2004-03-04 |
| III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG | |
| Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2004-03-08 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> ³ lebensfähig <input type="checkbox"/> ³ nicht mehr lebensfähig | |
| IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴ | |
| | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2004-03-09 |

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

| | | |
|-------|--|--|
| 0-1 | Formular PCT/RO/134 (SAFE) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material | |
| 0-1-1 | erstellt mit | PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.169) |
| 0-2 | Internationales Aktenzeichen | |
| 0-3 | Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts | 040061 BT |
| 1 | Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist | |
| 1-1 | Seite | 30-31 |
| 1-2 | Zeile | - |
| 1-3 | Angaben betr. Hinterlegung | |
| 1-3-1 | Name der Hinterlegungsstelle | DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH |
| 1-3-2 | Anschrift der Hinterlegungsstelle | Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany |
| 1-3-3 | Datum der Hinterlegung | 22. August 2001 (22.08.2001) |
| 1-3-4 | Eingangsnummer | DSMZ 14459 |
| 1-5 | Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden | alle Bestimmungsstaaten |
| 2 | Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/ oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist | |
| 2-1 | Seite | 32-33 |
| 2-2 | Zeile | - |
| 2-3 | Angaben betr. Hinterlegung | |
| 2-3-1 | Name der Hinterlegungsstelle | DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH |
| 2-3-2 | Anschrift der Hinterlegungsstelle | Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany |
| 2-3-3 | Datum der Hinterlegung | 04. März 2004 (04.03.2004) |
| 2-3-4 | Eingangsnummer | DSMZ 16275 |
| 2-5 | Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden | alle Bestimmungsstaaten |

| | | |
|--------------|--|--|
| 3 | Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist | |
| 3-1 | Seite | 34-35 |
| 3-2 | Zeile | - |
| 3-3 | Angaben betr. Hinterlegung | |
| 3-3-1 | Name der Hinterlegungsstelle | DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| 3-3-2 | Anschrift der Hinterlegungsstelle | Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany |
| 3-3-3 | Datum der Hinterlegung | 04. März 2004 (04.03.2004) |
| 3-3-4 | Eingangsnummer | DSMZ 16276 |
| 3-5 | Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden | alle Bestimmungsstaaten |

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

| | | |
|--------------|---|--------------------------------|
| 0-4 | Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein) | ja |
| 0-4-1 | Bevollmächtigter Bediensteter | Y. Marius-v.d. Neuveldt |

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

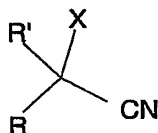
| | | |
|--------------|---|--|
| 0-5 | Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen | |
| 0-5-1 | Bevollmächtigter Bediensteter | |

Patentansprüche

1. Isolierte Polynukleotide, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 %
5 identisch sind mit den in den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen.
2. Polynukleotide gemäss Anspruch 1, ausgewählt aus der Gruppe:
 - 10 a) Polynukleotide, enthaltend die Nukleotidsequenzen SEQ ID NO:1, 4, 6, 9 oder dazu komplementäre Nukleotidsequenzen,
 - b) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen, die
15 den Sequenzen aus a) im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes entsprechen,
 - c) Polynukleotide enthaltend Nukleotidsequenzen gemäss a), die funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten,
 - d) Polynukleotide, die mit den komplementären
20 Sequenzen aus a) unter stringenten Bedingungen hybridisieren, wobei unter stringenten Bedingungen das Waschen in 5XSSC bei einer Temperatur von 50 bis 65°C verstanden wird,
wobei die Polynukleotide für eine cyanidtolerante
25 Nitrilhydratase kodieren.
3. Polypeptide, enthaltend Aminosäuresequenzen, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den Sequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3 und 5 oder 7, 8 und 10.
4. Polypeptide mit der Aktivität von cyanidtoleranten
30 Nitrilhydratasen gemäß Anspruch 3, deren Restaktivität

- nach der Umsetzung von Methacrylnitril in Gegenwart von 20 mM (mM=mmol/l) Cyanidionen bei 20°C nach 30 min. mindestens 90 % der Restaktivität desselben Enzyms beträgt, wenn diese unter ansonsten denselben Bedingungen in Abwesenheit von Cyanidionen für die Umsetzung eingestuft wurde.
- 5
5. Sonde oder Primer, enthaltend mindestens 20 aufeinanderfolgende Nukleotide aus den Sequenzen SEQ ID NO:1, 4, 6, 9.
- 10
6. Vektoren, enthaltend ein Polynukleotid, ausgewählt aus den gemäss den Ansprüchen 1 oder 2.
7. Wirtszelle, transformiert oder transfektiert durch die Einführung eines Polynukleotids gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2.
- 15
8. Wirtszelle, transformiert durch die Einführung eines Vektors gemäss Anspruch 6.
9. Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Amiden aus Nitrilen, das folgende Schritte aufweist:
- 20
- a) Umsetzung einer Nitrilgruppen enthaltenden Verbindung mit einem mikrobiellen Enzym (Polypeptid), das Nitrilhydratase-Aktivität aufweist und
- b) Abtrennung des gebildeten Amids
- wobei man für die Umsetzung des Nitrils zum Amid eine cyanidtolerante Nitrilhydratase gemäß den Ansprüchen 3 oder 4 einsetzt.
- 25
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man das genannte Enzym produzierende und enthaltende Mikroorganismen gemäss den Ansprüchen 7 oder 8 oder deren Lysat einsetzt.
- 30

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man ruhende Zelle des Mikroorganismus einsetzt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man eine gereinigte Nitrilhydratase einsetzt.
- 5 13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* stammt.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Enzym aus eingesetzten Mikroorganismen der Species *Pseudomonas putida* oder *Pseudomonas marginalis* 10 stammt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die eingesetzten Mikroorganismen unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276 hinterlegt sind.
- 15 16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formel



20

(I)

Rⁿ-CN

(II)

in der bedeuten:

X: OH, H, Alkyl, NH₂;

25

R: H, gesättigter Alkylrest mit 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder unverzweigt, gegebenenfalls NH₂-substituiert, ungesättigte Alkylreste mit einer Doppelbindung und 1 bis 12 C-Atomen, verzweigt oder

- unverzweigt, Cycloalkylgruppen mit 3 bis 6 C-
Atomen,
mit Alkylthiogruppen substituierte
Alkylenreste, wobei Alkyl hier einem C₁ bis C₃-
5 Rest
und Alkylen einem zweiwertigen C₃ bis C₈-Rest
entspricht,
R': H, Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen,
R'': ein- oder zweikerniger ungesättigter Ring, mit 6
10 bis 12 C-Atomen, gegebenenfalls mit einer oder
zwei Alkylgruppen (C₁ - C₃), Cl, Br, F.
Alkylnitritrest mit 1 bis 6 C-Atomen
zu den entsprechenden Amiden umgesetzt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet,
15 dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel(I) in
Gegenwart von Blausäure oder einem Salz der Blausäure
umsetzt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet,
20 dass man die Umsetzung in Gegenwart einer
Anfangskonzentration von mehr als 0,5 mol% Cyanid bis
3 mol% Cyanid, bezogen auf das eingesetzte Nitril,
durchführt.
19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-
25 Amino-4-methylthiobutyronitril einsetzt.
20. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-
Hydroxy-4-methylthiobutyronitril einsetzt,
gegebenenfalls enthalten in der Reaktionsmischung aus
30 der Herstellung dieses Nitrils.
21. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 9
bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nitril 2-
Hydroxy-2-methylpropionitril einsetzt.

22. Verfahren gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung von den Zellen der Biomasse trennt und das Amid zu der entsprechenden Säure verseift.
- 5 23. Verfahren gemäss den Ansprüchen 9 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass man das Amid bzw. die das Amid enthaltende Lösung von den Zellen der Biomasse trennt und das Amid mit Alkali- oder
10 Erdalkalimetallhydroxiden zu den Salzen der entsprechenden Carbonsäuren verseift.
24. Verfahren gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass man MHA-Amid mit Calciumhydroxid verseift und das Calciumsalz gewinnt.
- 15 25. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 9 bis 24, wobei man
- 20 a) Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* fermentiert, in denen man isolierte Polynukleotide, die für Polypeptide mit den Aminosäuresequenzen kodieren, die zu 90 bis 100 % identisch sind mit den in den Sequenzen mit den Sequenzen SEQ ID NO:2, 3, 5, 7, 8, 10 enthaltenden Aminosäuresequenzen, wobei die Polypeptide die Aktivität einer cyanidtoleranten Nitrilhydratase besitzen, verstärkt, insbesondere
25 rekombinant überexprimiert,
- b) aus diesen Mikroorganismen das rekombinant erzeugte Enzym mit Nitrilhydrataseaktivität gegebenenfalls isoliert oder eine dieses Enzym enthaltende Proteinfraktion herstellt, und
- 30 c) die Mikroorganismen gemäss a) oder das Enzym oder die dieses enthaltende Fraktion gemäss b) in ein Medium überführt, das eine Nitrilgruppen-haltige

Verbindung der allgemeinen Formeln (I) oder (II) enthält.

26. Verfahren gemäss einem oder mehreren der Ansprüche 9
bis 24, wobei man Wirtszellen gemäss den Ansprüchen 7
oder 8 einsetzt.
27. Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt
unter den Nummern DSM 16275 und DSM 16276.
28. Cyanidtolerante Nitrilhydratasen, isoliert aus den
Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, hinterlegt unter den
Nummern DSM 16275 und DSM 16276.

Abbildung 1

MA32

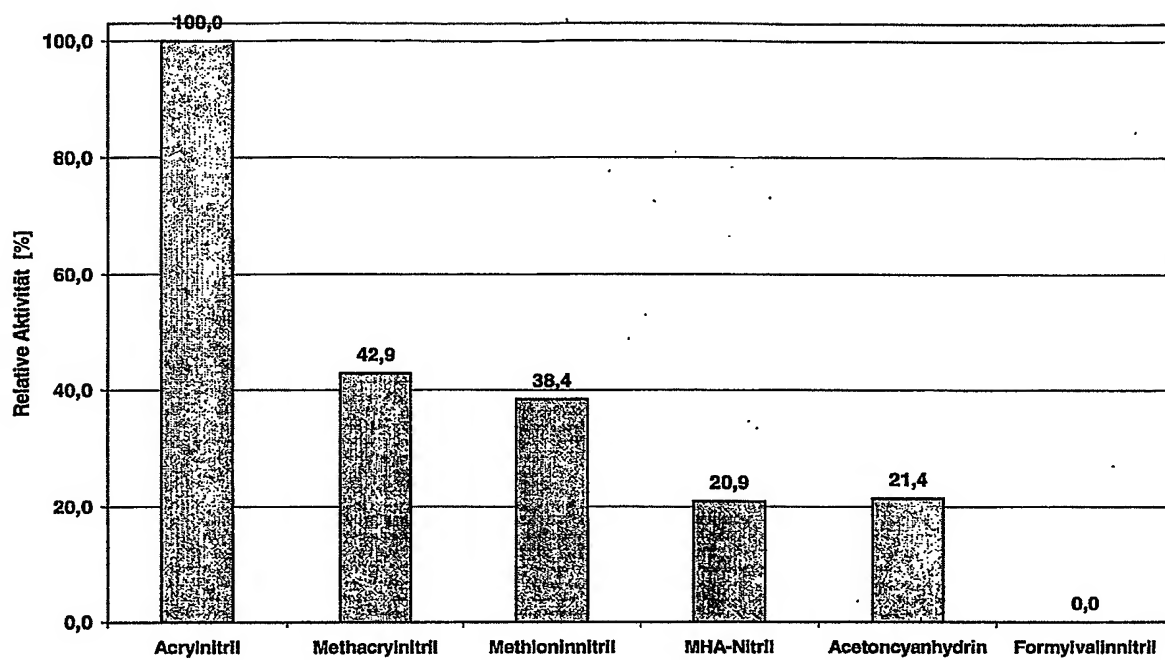


Abbildung 2

MA113

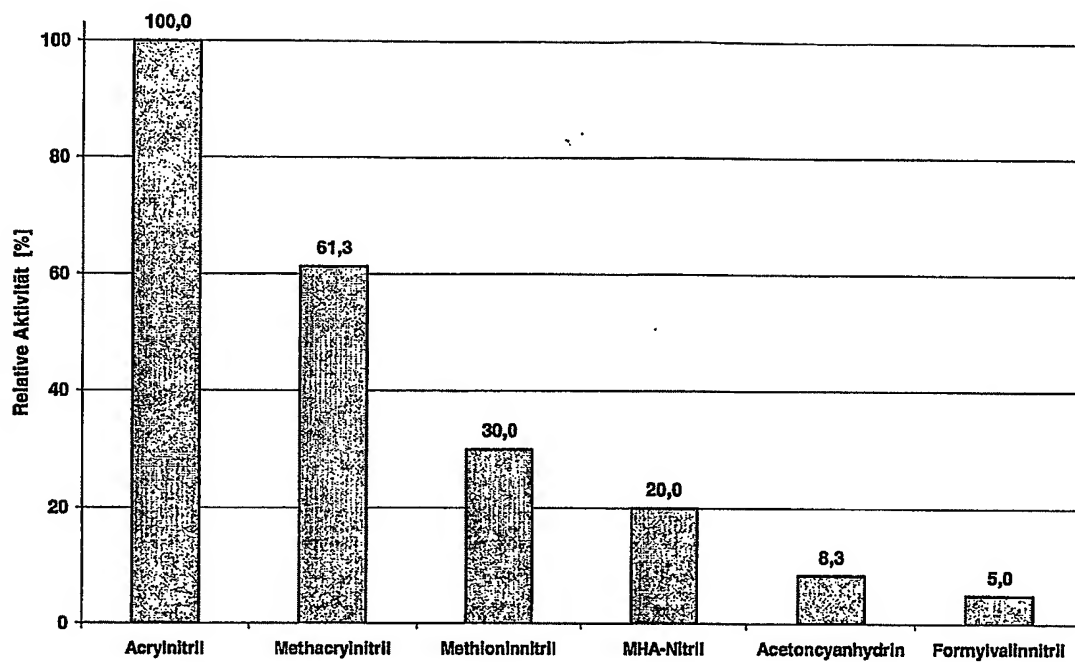


Abbildung 3

MA31

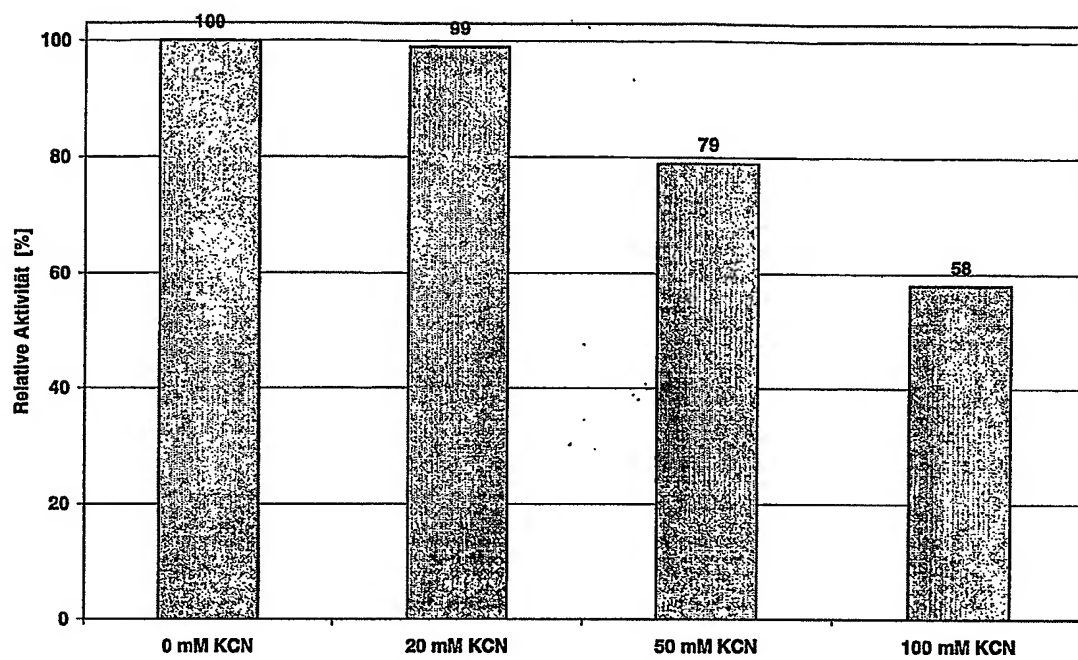


Abbildung 4

MA113

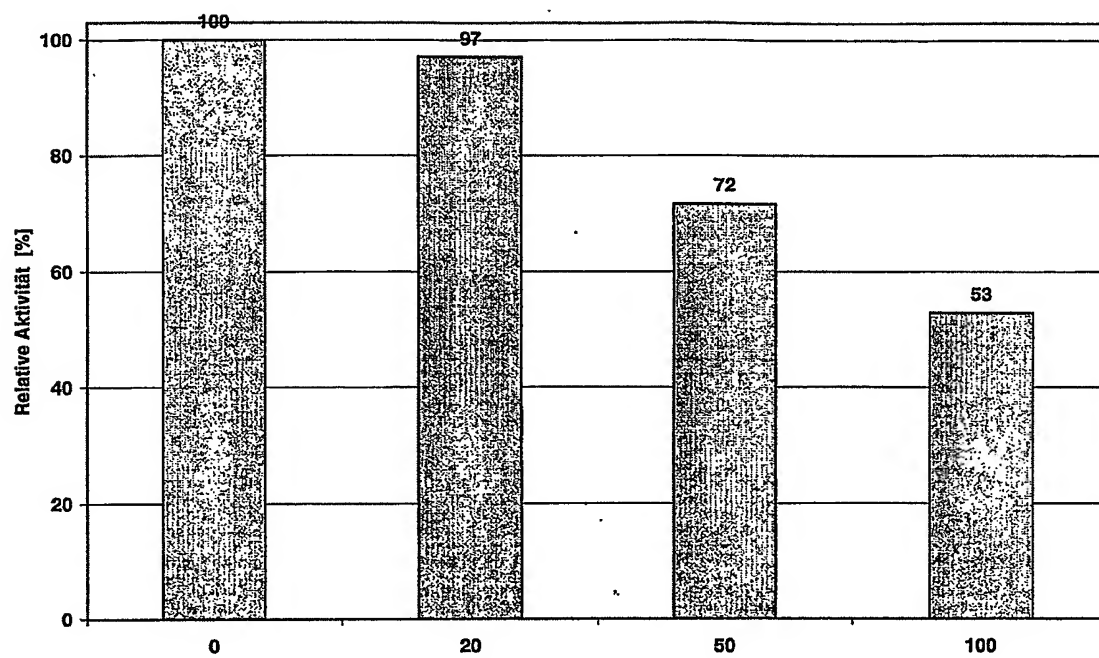


Abbildung 5

MA113

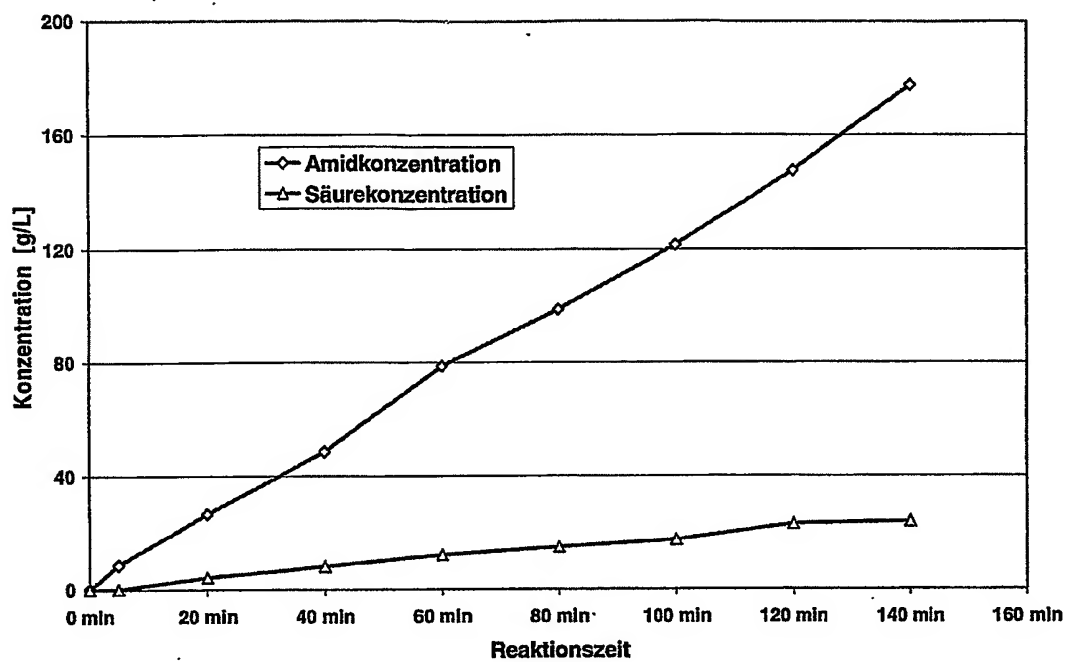


Abbildung 6

MA32

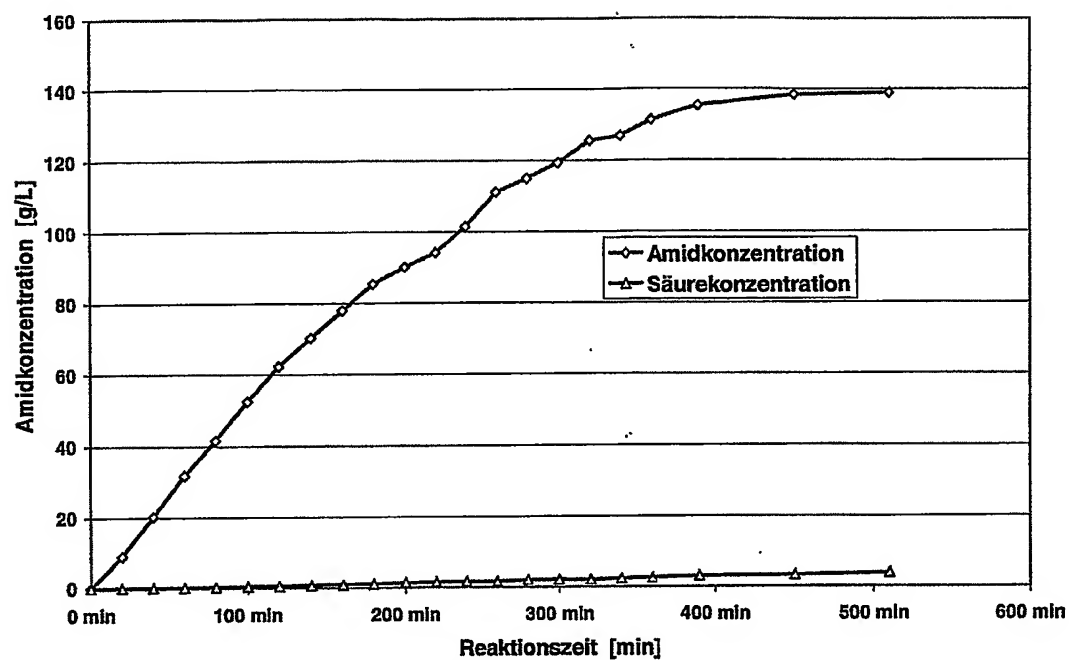
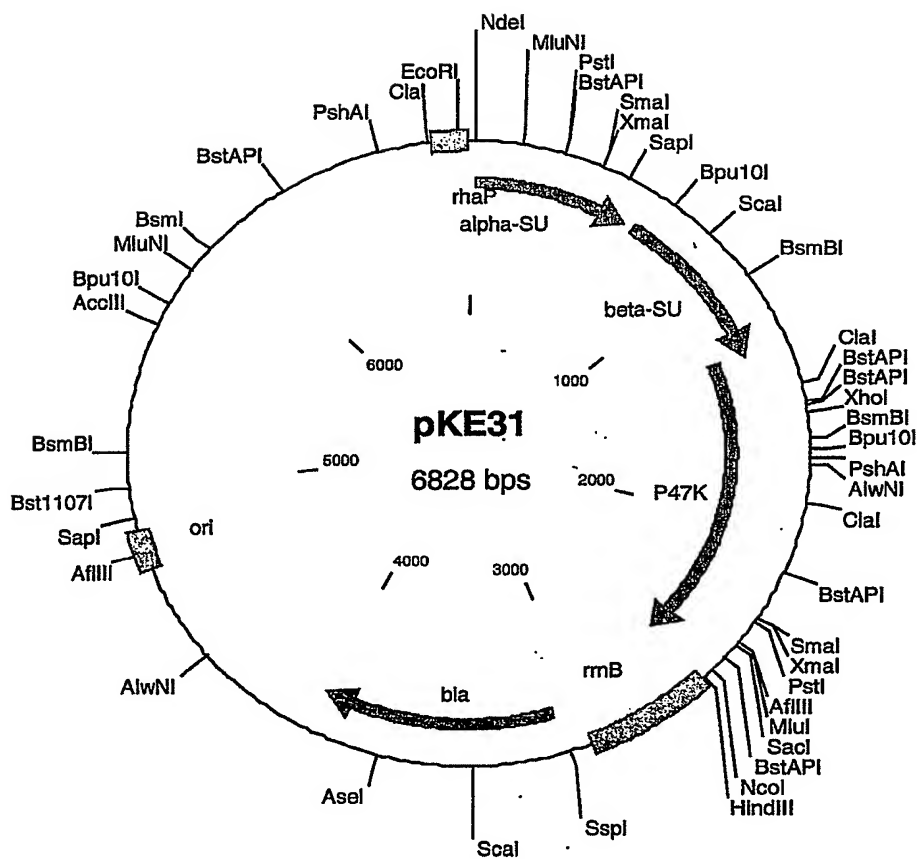


Abbildung 7



SEQUENCE LISTING

```

<110> Degussa AG
5 <120> Cyanidtolerante Nitrilhydratasen.
<130> 040061
<160> 14
10 <170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 6828
15 <212> DNA
<213> Pseudomonas marginalis
<220>
20 <221> CDS
<222> (25)..(609)
<223> Gen der Kodierregion der alpha-Untereinheit
<220>
25 <221> CDS
<222> (650)..(1312)
<223> Gen der Kodierregion der beta-Untereinheit
<220>
30 <221> gene
<222> (1309)..(2577)
<223> Gen des Aktivatorproteins
<400> 1
35 aattcttaag aaggagatat acat atg agt aca gct act tca acg ccc ggc 51
Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly
1 5
40 gaa aga gcc tgg gca ttg ttt caa gtc ctc aag agc aag gaa ctc atc 99
Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile
10 15 20 25
45 ccg gag ggc tat gtc gag cag ctc acg caa ttg atg gag cac ggc tgg 147
Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp
30 35 40
50 agc ccc gag aac ggc gcc cgt gtg gtg gcc aag gcg tgg gtc gat ccg 195
Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro
45 50 55
55 cag ttc cgg gca ctg ttg ctc aag gac ggc acc gcg gcc tgc gcc cag 243
Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln
60 65 70
60 ttc ggc tac acc ggc ccc cag ggc gaa tac atc gtt gcc ctg gag gat 291
Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp
75 80 85
60 acg ccg acg ctg aag aac gtg att gtc tgc agc ctg tgc tcc tgc acc 339
Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr
90 95 100 105

```

| | | |
|----|--|------|
| | aac tgg ccg gtc ctc ggc ctg cca ccg gag tgg tac aag ggt ttc gag | 387 |
| | Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu | |
| | 110 115 120 | |
| 5 | ttc cgc gca cgc ctg gtc cgg gag ggg cgc acg gta ctg cgc gag ctg | 435 |
| | Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu | |
| | 125 130 135 | |
| 10 | ggg acg gag ttg ccc cgg gac atg gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc | 483 |
| | Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser | |
| | 140 145 150 | |
| 15 | gcc gaa agc cgc tac ctg gtg ctg ccg gtc agg ccg gaa ggc tca gaa | 531 |
| | Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu | |
| | 155 160 165 | |
| 20 | cac atg agc gaa gag cag ctt caa gcg ctg gtg acc aaa gac gtg ctg | 579 |
| | His Met Ser Glu Glu Gln Leu Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu | |
| | 170 175 180 185 | |
| | atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtg ggc tga gaacaacacc tcatcatcgt | 629 |
| | Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val Gly | |
| | 190 | |
| 25 | tcactcccg agttttgatt atg gat ggc ttt cac gat ctc ggc ggt ttc caa | 682 |
| | Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln | |
| | 195 200 205 | |
| 30 | ggc ttt gga aaa gtc cct cac acc atc aac agc ctg agc tac aaa cag | 730 |
| | Gly Phe Gly Lys Val Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln | |
| | 210 215 220 | |
| 35 | gtg ttc aag cag gac tgg gag cat ctg gcc tac agc ttg atg ttc atc | 778 |
| | Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile | |
| | 225 230 235 | |
| 40 | ggt gcc gac cac ttg aaa aag ttc agc gtg gac gaa gtg cgt cac gcc | 826 |
| | Gly Ala Asp His Leu Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala | |
| | 240 245 250 | |
| | gtc gaa cgc ctg gat gtg cgc cag cat gtc ggc acc cag tac tac gaa | 874 |
| | Val Glu Arg Leu Asp Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu | |
| | 255 260 265 | |
| 45 | cgc tac gtc atc gcg acc gcc acc ctg ctg gtc gaa acc ggc gtg atc | 922 |
| | Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile | |
| | 270 275 280 285 | |
| 50 | acc cag gcg gag ctt gat cag gcc ttg ggc tcc cac ttc aag ctg gcg | 970 |
| | Thr Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala | |
| | 290 295 300 | |
| 55 | aat ccc gcc cat gcc gag ggc cgc ccg gcg att acg ggg cgg ccg ccc | 1018 |
| | Asn Pro Ala His Ala Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro | |
| | 305 310 315 | |
| | ttc gag gtg ggg gat cgg gtg gtg gtg cga gac gaa tat gtg gct gga | 1066 |
| | Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly | |
| | 320 325 330 | |

| | | |
|----|---|------|
| | cac atc cgc atg ccc gcc tac gtg cgc ggc aag gaa ggc gtg gtc ctg | 1114 |
| | His Ile Arg Met Pro Ala Tyr Val Arg Gly Lys Glu Gly Val Val Leu | |
| | 335 340 345 | |
| 5 | cac cgc acg tca gag aaa tgg ccg ttc ccc gac gca atc ggg cat ggc | 1162 |
| | His Arg Thr Ser Glu Lys Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly | |
| | 350 355 360 365 | |
| 10 | gat gta agc gca gcc cat caa ccc acc tac cac gtc gag ttc gcc gtg | 1210 |
| | Asp Val Ser Ala Ala His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Ala Val | |
| | 370 375 380 | |
| 15 | aag gac ctg tgg gga gat gcc gcc gat gag ggt ttt gtg gtg gtc gac | 1258 |
| | Lys Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala Asp Glu Gly Phe Val Val Val Asp | |
| | 385 390 395 | |
| 20 | ctg ttc gaa agc tac ctg gac aag gcc gcc ggc gcg cgc gcg gtg aac | 1306 |
| | Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Lys Ala Ala Gly Ala Arg Ala Val Asn | |
| | 400 405 410 | |
| | cca tga cagacggcgc ccaggcaagc cgactgccgg tgacggtcct ttcgggcttc | 1362 |
| | Pro | |
| 25 | ctcggcgccg gcaagaccac cctgctcaac cacatcctgc gcaatcgcca aggcctgcgc | 1422 |
| | gtggccgtca tegtcaatga catgagcgaa gtcaatatcg atgccgaaga ggtgcagcgc | 1482 |
| 30 | gatgtcgcgc tgcaccgtgg tcgcgatgag ctgatcgaga tgagcaacgg gtgcatctgc | 1542 |
| | tgcaccctgc gcgccgattt gctcgagcag atcagcatgc tcgcacgcca acagcggttc | 1602 |
| | gattacctgc tgattgaatc cacggggatc tccgagccga tgccgggtcgc ggagacgttc | 1662 |
| 35 | gccttccttg acgctgatgg cttcagcctc agcgaactgg cgcgcctgga caccttgggtg | 1722 |
| | acgggtgggtcg atggcagtcg tttccaggaa ctgctcgaat cgccgcacac cgttgaccag | 1782 |
| 40 | gatgacgcca cgccagacgc acccaagcgc cacctggccg atctgctgat cgaacagggtg | 1842 |
| | gagtacgcca acgtcattct cgtcaataag ctggatctga tcgatgcagc gcagtatcag | 1902 |
| | gccgtgcagg cgatcctcac aggccttaac ccgacggcgc ggatcatgcc gatggcccac | 1962 |
| 45 | ggtaacatcc catcagccag cctgctcggc acccatctgt ttgatttacc cagcctcgcg | 2022 |
| | gcgtcgccgg gctggatgcg gaaaatggag gcggcagacg cgccggcctc cgagtccggac | 2082 |
| 50 | acctatggcg tgacgtcctg ggtgtaccgt gagcgcgcac ctttccaccc gcaacgggtg | 2142 |
| | ctcgactttc tccagcagcc ctgggtgcaac gggcggttgc tcgcgagcaa aggttacttc | 2202 |
| | tggcttgcca gccgccacct ggaaaccggc ctgctgggtgc aaagcggcaa gcggttccag | 2262 |
| 55 | tgggactatg tcgggcgctg gtggaacttc atcgagccgt cgcaatggcc ccgggacgaa | 2322 |
| | taccggctgc agggcatcag ggccaaatgg gacagcgtgg tcggcgactg ccggcaggag | 2382 |
| 60 | ttggtgttta tcggccaggg cctcgacacc gacgcgttac agcgcgagct cgaccactgc | 2442 |
| | ctgctgagcg ccaggaaat cgcgcgcggc ccactggcct ggcaagcgct gccaggggcg | 2502 |

| | | |
|----|---|------|
| | accgcctttg accgacagac ccttgcccgc ccccccacaca gcccatggcg attgccccca | 2562 |
| 5 | tttgatccga gatagaagct tctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca | 2622 |
| | gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc | 2682 |
| | ggtggtocca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaac cgccgtagcg ccgatggtag | 2742 |
| 10 | tgtggggtct ccccatgcga gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc | 2802 |
| | agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacgct ctcttgagta | 2862 |
| 15 | ggacaaatcc gccgggagcg gatttgaacg ttgcgaagca acggcccgga ggtggcgagg | 2922 |
| | caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg | 2982 |
| | gccttttttgc gtttctacaa actcttttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat | 3042 |
| 20 | ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg | 3102 |
| | agtattcaac atttcctgtg cgccttatt ccttttttgc cggcattttg ccttcctgtt | 3162 |
| 25 | tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggtgcaaga | 3222 |
| | gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa | 3282 |
| | gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt | 3342 |
| 30 | gttgacgccg ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt | 3402 |
| | gagtaotcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc | 3462 |
| 35 | agtctgccca taaccatgag tgataaact gcggccaact tacttctgac aacgatogga | 3522 |
| | ggacogaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat | 3582 |
| | cgttgggaac cggagctgaa tgaagcata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct | 3642 |
| 40 | gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc | 3702 |
| | cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg | 3762 |
| 45 | gcccctccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc | 3822 |
| | ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg | 3882 |
| | acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca | 3942 |
| 50 | ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta | 4002 |
| | aaacttcatt ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc | 4062 |
| 55 | aaaatccctt aacgtgagtt ttogttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa | 4122 |
| | ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca | 4182 |
| | ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta | 4242 |
| 60 | actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc | 4302 |
| | caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgtttacca | 4362 |

| | | | | | | | |
|----|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| | gtggctgctg | ccagtggcga | taagtcgtgt | cttaccgggt | tggaactcaag | acgatagtta | 4422 |
| 5 | ccggataagg | cgcagcggtc | gggctgaacg | gggggttegt | gcacacagcc | cagcttggag | 4482 |
| | cgaacgacct | acaccgaact | gagataccta | cagcgtgagc | tatgagaaag | cgccaacgctt | 4542 |
| | cccgaagggg | gaaaggcggg | caggtatccg | gtaagcggca | gggtcgggaa | aggagagcgc | 4602 |
| 10 | acgagggagc | ttccaggggg | aaacgcctgg | tatctttata | gtcctgtcgg | gtttcgccac | 4662 |
| | ctctgacttg | agcgtcgatt | tttgtgatgc | tcgtcagggg | ggcggagcct | atggaaaaac | 4722 |
| 15 | gccagcaacg | cggccttttt | acggttcctg | gcctttttgt | ggcctttttg | tcacatgttc | 4782 |
| | tttctctcgt | tatccctga | ttctgtggat | aaccgtatta | ccgcctttga | gtgagctgat | 4842 |
| | accgctcgcc | gcagccgaac | gaccgagcgc | agcgagtcag | tgagcgagga | agcggaagag | 4902 |
| 20 | cgctgatgc | ggtattttct | cottaogcat | ctgtgcggta | tttcacaccg | catatatggt | 4962 |
| | gcactctcag | tacaatctgc | tctgatgccg | catagttaag | ccagtataca | ctccgctatc | 5022 |
| 25 | gctacgtgac | tgggtcatgg | ctgcgccccg | acaccgcca | acaccgctg | acgcgccttg | 5082 |
| | acgggcttgt | ctgctcccgg | catccgctta | cagacaagct | gtgaccgtct | ccgggagctg | 5142 |
| | catgtgtcag | aggttttcac | cgtcacacc | gaaacgcgcg | aggcagctgc | ggtaaagctc | 5202 |
| 30 | atcagcgtgg | tcgtgaagcg | attcacagat | gtctgcctgt | tcacccgctg | ccagctcggt | 5262 |
| | gagtttctcc | agaagcgcta | atgtctggct | tctgataaag | cgggccatgt | taagggcggt | 5322 |
| 35 | tttttctcgt | ttggtcactt | gatgcctccg | tgtaaggggg | aatttctggt | catgggggta | 5382 |
| | atgataccga | tgaaacgaga | gaggatgctc | acgatacggg | ttactgatga | tgaacatgcc | 5442 |
| | cggttactgg | aacgttgatg | gggtaaacaa | ctggcggtat | ggatgcggcg | ggaccagaga | 5502 |
| 40 | aaaatcactc | agggtcaatg | ccagcgcttc | gttaatacag | atgtaggtgt | tccacagggg | 5562 |
| | agccagcagc | atcctgcgat | gcagatccgg | aacataatgg | tgagggcgcg | tgacttccgc | 5622 |
| 45 | gtttccagac | tttacgaaac | acggaaaccg | aagaccattc | atgttggtgc | tcaggtcgca | 5682 |
| | gacgttttgc | agcagcagtc | gcttcaagtt | cgctcgcgta | tcgggtgattc | attctgctaa | 5742 |
| | ccagtaaggc | aaccccgcca | gcctagccgg | gtcctcaacg | acaggagcac | gatcatgcgc | 5802 |
| 50 | acccgtggcc | aggaccaaac | gctgcccag | atgcgccgcg | tgccgctgct | ggagatggcg | 5862 |
| | gacgcgatgg | atatgttctg | ccaagggttg | gtttgcgcgt | tcacagttct | ccgcaagaat | 5922 |
| 55 | tgattggctc | caattcttgg | agtgggtgaat | ccgttagcga | gggtgccgccg | gcttccattc | 5982 |
| | aggtcgaggt | ggcccggctc | catgcaccgc | gacgcaacgc | ggggaggcag | acaagggtata | 6042 |
| | ggcgggcgcg | cctacaatcc | atgccaaccc | gttccatgtg | ctcgccgagg | cggcataaat | 6102 |
| 60 | cgccgtgacg | atcagcggtc | cagtgatcga | agttaggtg | gtaagagccg | cgagcgatcc | 6162 |
| | ttgaagctgt | ccctgatggg | cgtcatctac | ctgcctggac | agcatggcct | gcaacgcggg | 6222 |

catcccgatg cgcgcggaag cgagaagaat cataatgggg aaggccatcc agcctcgcgt 6282
 5 cgcgaacgcc agcaagacgt agcccagcgc gtccggccgcc atgccggcga taatggcctg 6342
 cttctcgcgc aaacgttttg tggcgggacc agtgacgaag gcttgagcga gggcgtgcaa 6402
 gattccgaat accgcaagcg acaggccgat catcgctcgcg ctccagcgaa agcggtcctc 6462
 10 gccgaaaatg acccagagcg ctgccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac 6522
 agtcataagt gcggcgacga tagtcatgcc ccgcgccac cggaaggagc tgactgggtt 6582
 15 gaaggctctc aagggcatcg gtcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca 6642
 gcccagtagt aggttgaggc cgttgagcac cgcgcgcga aggaatggtg catgcatcga 6702
 tcaccacaat tcagcaaatt gtgaacatca tcacgttcac ctttccctgg ttgccaatgg 6762
 20 cccattttcc tgtcagtaac gagaaggctc cgaattcagg cgcttttttag actggtcgta 6822
 atgaac 6828

25 <210> 2
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas marginalis*

30 <400> 2

Met Ser Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Trp Ala Leu Phe
 1 5 10 15

35 Gln Val Leu Lys Ser Lys Glu Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Val Glu Gln
 20 25 30

40 Leu Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg
 35 40 45

45 Val Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Ala Leu Leu Leu
 50 55 60

50 Lys Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Tyr Thr Gly Pro Gln
 65 70 75 80

Gly Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val
 85 90 95

55 Ile Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu
 100 105 110

60 Pro Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg
 115 120 125

Glu Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Arg Asp
 130 135 140
 5
 Met Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val
 145 150 155 160
 10
 Leu Pro Val Arg Pro Glu Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu
 165 170 175
 15
 Gln Ala Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg
 180 185 190
 Val Gly
 20
 <210> 3
 <211> 220
 <212> PRT
 25 <213> *Pseudomonas marginalis*
 <400> 3
 30 Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val
 1 5 10 15
 Pro His Thr Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp
 20 25 30
 35 Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Ala Asp His Leu
 35 40 45
 40 Lys Lys Phe Ser Val Asp Glu Val Arg His Ala Val Glu Arg Leu Asp
 50 55 60
 45 Val Arg Gln His Val Gly Thr Gln Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala
 65 70 75 80
 50 Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu
 85 90 95
 Asp Gln Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala
 100 105 110
 55 Glu Gly Arg Pro Ala Ile Thr Gly Arg Pro Pro Phe Glu Val Gly Asp
 115 120 125
 60 Arg Val Val Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Ile Arg Met Pro
 130 135 140

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Ala | Tyr | Val | Arg | Gly | Lys | Glu | Gly | Val | Val | Leu | His | Arg | Thr | Ser | Glu | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Lys | Trp | Pro | Phe | Pro | Asp | Ala | Ile | Gly | His | Gly | Asp | Val | Ser | Ala | Ala | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | His | Gln | Pro | Thr | Tyr | His | Val | Glu | Phe | Ala | Val | Lys | Asp | Leu | Trp | Gly | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Asp | Ala | Ala | Asp | Glu | Gly | Phe | Val | Val | Val | Asp | Leu | Phe | Glu | Ser | Tyr | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Leu | Asp | Lys | Ala | Ala | Gly | Ala | Arg | Ala | Val | Asn | Pro | | | | | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <210> | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 1269 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | <212> | DNA | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Pseudomonas marginalis | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <221> | CDS | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <222> | (1)..(1269) | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Gen der Kodierregion des Aktivatorproteins | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | atg | aca | gac | ggc | gcc | cag | gca | agc | cga | ctg | ccg | gtg | acg | gtc | ctt | tgc | 48 |
| | Met | Thr | Asp | Gly | Ala | Gln | Ala | Ser | Arg | Leu | Pro | Val | Thr | Val | Leu | Ser | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ggc | ttc | ctc | ggc | gcc | ggc | aag | acc | acc | ctg | ctc | aac | cac | atc | ctg | cgc | 96 |
| 40 | Gly | Phe | Leu | Gly | Ala | Gly | Lys | Thr | Thr | Leu | Leu | Asn | His | Ile | Leu | Arg | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | aat | cgc | gaa | ggc | ctg | cgc | gtg | gcc | gtc | atc | gtc | aat | gac | atg | agc | gaa | 144 |
| 45 | Asn | Arg | Glu | Gly | Leu | Arg | Val | Ala | Val | Ile | Val | Asn | Asp | Met | Ser | Glu | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | gtc | aat | atc | gat | gcc | gaa | gag | gtg | cag | cgc | gat | gtc | gcg | ctg | cac | cgt | 192 |
| | Val | Asn | Ile | Asp | Ala | Glu | Glu | Val | Gln | Arg | Asp | Val | Ala | Leu | His | Arg | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ggg | cgc | gat | gag | ctg | atc | gag | atg | agc | aac | | | | | | | |

| | | |
|----|---|------|
| | ccg gtc gcg gag acg ttc gcc ttc ctt gac gct gat ggc ttc agc ctc | 384 |
| | Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu | |
| | 115 120 125 | |
| 5 | agc gaa ctg gcg cgc ctg gac acc ttg gtg acg gtg gtc gat ggc agt | 432 |
| | Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Gly Ser | |
| | 130 135 140 | |
| 10 | cgt ttc cag gaa ctg ctc gaa tcg ccg cac acc gtt gac cag gat gac | 480 |
| | Arg Phe Gln Glu Leu Leu Glu Ser Pro His Thr Val Asp Gln Asp Asp | |
| | 145 150 155 160 | |
| 15 | gcc acg cca gac gca ccc aag cgc cac ctg gcc gat ctg ctg atc gaa | 528 |
| | Ala Thr Pro Asp Ala Pro Lys Arg His Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu | |
| | 165 170 175 | |
| 20 | cag gtg gag tac gcc aac gtc att ctc gtc aat aag ctg gat ctg atc | 576 |
| | Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Leu Asp Leu Ile | |
| | 180 185 190 | |
| 25 | gat gca gcg cag tat cag gcc gtg cag gcg atc ctc aca ggc ctt aac | 624 |
| | Asp Ala Ala Gln Tyr Gln Ala Val Gln Ala Ile Leu Thr Gly Leu Asn | |
| | 195 200 205 | |
| 30 | ccg acg gcg cgg atc atg ccg atg gcc cac ggt aac atc cca tca gcc | 672 |
| | Pro Thr Ala Arg Ile Met Pro Met Ala His Gly Asn Ile Pro Ser Ala | |
| | 210 215 220 | |
| 35 | agc ctg ctc ggc acc cat ctg ttt gat tta ccc agc ctc gcg gcg tcg | 720 |
| | Ser Leu Leu Gly Thr His Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ser | |
| | 225 230 235 240 | |
| 40 | ccg ggc tgg atg cgg aaa atg gag gcg gca gac gcg ccg gcc tcc gag | 768 |
| | Pro Gly Trp Met Arg Lys Met Glu Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ser Glu | |
| | 245 250 255 | |
| 45 | tcg gac acc tat ggc gtg acg tcc tgg gtg tac cgt gag cgc gca cct | 816 |
| | Ser Asp Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro | |
| | 260 265 270 | |
| 50 | ttc cac ccg caa cgg ttg ctc gac ttt ctc cag cag ccc tgg tgc aac | 864 |
| | Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Gln Gln Pro Trp Cys Asn | |
| | 275 280 285 | |
| 55 | ggg cgg ttg ctg cgc agc aaa ggt tac ttc tgg ctt gcc agc cgc cac | 912 |
| | Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His | |
| | 290 295 300 | |
| 60 | ctg gaa acc ggc ctg ctg gtg caa agc ggc aag cgg ttc cag tgg gac | 960 |
| | Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Gln Ser Gly Lys Arg Phe Gln Trp Asp | |
| | 305 310 315 320 | |
| 65 | tat gtc ggg cgc tgg tgg aac ttc atc gag ccg tcg caa tgg ccc cgg | 1008 |
| | Tyr Val Gly Arg Trp Trp Asn Phe Ile Glu Pro Ser Gln Trp Pro Arg | |
| | 325 330 335 | |
| 70 | gac gaa tac cgg ctg cag gcc atc agg gcc aaa tgg gac agc gtg gtc | 1056 |
| | Asp Glu Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Arg Ala Lys Trp Asp Ser Val Val | |
| | 340 345 350 | |

5 ggc gac tgc cgg cag gag ttg gtg ttt atc ggc cag ggc ctc gac acc 1104
 Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe Ile Gly Gln Gly Leu Asp Thr
 355 360 365

10 gac gcg tta cag cgc gag ctc gac cac tgc ctg ctg agc gcc cag gaa 1152
 Asp Ala Leu Gln Arg Glu Leu Asp His Cys Leu Leu Ser Ala Gln Glu
 370 375 380

15 atc gcc gcc ggc cca ctg gcc tgg caa gcg ctg cca ggg gcg acc gcc 1200
 Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala
 385 390 395 400

20 ttt gac cga cag acc ctt gcc cgc ccc cca cac agc cca tgg cga ttg 1248
 Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu
 405 410 415

25 ccc cca ttt gat ccg aga tag 1269
 Pro Pro Phe Asp Pro Arg
 420

30 <210> 5
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas marginalis
 <400> 5

35 Met Thr Asp Gly Ala Gln Ala Ser Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser
 1 5 10 15

40 Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg
 20 25 30

45 Asn Arg Glu Gly Leu Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu
 35 40 45

50 Val Asn Ile Asp Ala Glu Glu Val Gln Arg Asp Val Ala Leu His Arg
 50 55 60

55 Gly Arg Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr
 65 70 75 80

60 Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Met Leu Ala Arg Gln Gln
 85 90 95

65 Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met
 100 105 110

70 Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asp Gly Phe Ser Leu
 115 120 125

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Ser | Glu | Leu | Ala | Arg | Leu | Asp | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Val | Asp | Gly | Ser | |
| | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| 5 | Arg | Phe | Gln | Glu | Leu | Leu | Glu | Ser | Pro | His | Thr | Val | Asp | Gln | Asp | Asp | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| 10 | Ala | Thr | Pro | Asp | Ala | Pro | Lys | Arg | His | Leu | Ala | Asp | Leu | Leu | Ile | Glu | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| 15 | Gln | Val | Glu | Tyr | Ala | Asn | Val | Ile | Leu | Val | Asn | Lys | Leu | Asp | Leu | Ile | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| 20 | Asp | Ala | Ala | Gln | Tyr | Gln | Ala | Val | Gln | Ala | Ile | Leu | Thr | Gly | Leu | Asn | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| 25 | Pro | Thr | Ala | Arg | Ile | Met | Pro | Met | Ala | His | Gly | Asn | Ile | Pro | Ser | Ala | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| 30 | Ser | Leu | Leu | Gly | Thr | His | Leu | Phe | Asp | Leu | Pro | Ser | Leu | Ala | Ala | Ser | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| 35 | Pro | Gly | Trp | Met | Arg | Lys | Met | Glu | Ala | Ala | Asp | Ala | Pro | Ala | Ser | Glu | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| 40 | Ser | Asp | Thr | Tyr | Gly | Val | Thr | Ser | Trp | Val | Tyr | Arg | Glu | Arg | Ala | Pro | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| 45 | Phe | His | Pro | Gln | Arg | Leu | Leu | Asp | Phe | Leu | Gln | Gln | Pro | Trp | Cys | Asn | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| 50 | Gly | Arg | Leu | Leu | Arg | Ser | Lys | Gly | Tyr | Phe | Trp | Leu | Ala | Ser | Arg | His | |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| 55 | Leu | Glu | Thr | Gly | Leu | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Lys | Arg | Phe | Gln | Trp | Asp | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| 60 | Tyr | Val | Gly | Arg | Trp | Trp | Asn | Phe | Ile | Glu | Pro | Ser | Gln | Trp | Pro | Arg | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| 65 | Asp | Glu | Tyr | Arg | Leu | Gln | Gly | Ile | Arg | Ala | Lys | Trp | Asp | Ser | Val | Val | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| 70 | Gly | Asp | Cys | Arg | Gln | Glu | Leu | Val | Phe | Ile | Gly | Gln | Gly | Leu | Asp | Thr | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| 75 | Asp | Ala | Leu | Gln | Arg | Glu | Leu | Asp | His | Cys | Leu | Leu | Ser | Ala | Gln | Glu | |
| | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |

Ile Ala Ala Gly Pro Leu Ala Trp Gln Ala Leu Pro Gly Ala Thr Ala
 385 390 395 400

5 Phe Asp Arg Gln Thr Leu Ala Arg Pro Pro His Ser Pro Trp Arg Leu
 405 410 415

10 Pro Pro Phe Asp Pro Arg
 420

<210> 6
 <211> 2371
 15 <212> DNA
 <213> Pseudomonas putida

<220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(582)
 <223> Gen der Kodierregion der alpha-Untereinheit

<220>
 25 <221> CDS
 <222> (624)..(1286)
 <223> Gen der Kodierregion der beta-Untereinheit

<220>
 30 <221> gene
 <222> (1283)..(2371)
 <223> Gen des Aktivatorproteins

<400> 6
 35 atg acg gca act tca acc cct ggt gag cgg gca cgc gca ttg ttt gca 48
 Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala
 1 5 10 15

40 gtg ctc aag cgc aaa gac ctc atc ccc gag ggc tac atc gaa cag ctc 96
 Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu
 20 25 30

45 acc cag ctg atg gaa cac ggc tgg agc ccg gaa aac ggc gcg cgc atc 144
 Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile
 35 40 45

50 gtc gcc aag gcc tgg gtc gat ccg cag ttt cgc gag ctg ctg ctc aag 192
 Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys
 50 55 60

55 gac ggt acg gcc gcc tgc gcc cag ttc ggc ttc acc ggc cca caa ggc 240
 Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly
 65 70 75 80

60 gaa tac atc gtc gcc ctg gaa gac acc ccg cag ttg aaa aac gtg atc 288
 Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile
 85 90 95

60 gtc tgt agc ctg tgc tcc tgc acg aac tgg ccg gtg ctg ggc ctg cca 336
 Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro
 100 105 110

| | | |
|----|--|------|
| | cct gag tgg tac aag ggc ttc gag ttc cgt gcg cgg ttg gtc cgg gag | 384 |
| | Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu | |
| | 115 120 125 | |
| 5 | ggg cgc acg gta ttg cgc gag ctg ggc acc gag ttg ccc ggc gac atg | 432 |
| | Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met | |
| | 130 135 140 | |
| 10 | gtg gtc aag gtc tgg gac acc agc gct gaa agc cgc tac ctg gtg ctg | 480 |
| | Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu | |
| | 145 150 155 160 | |
| 15 | ccg caa cga cca gcg ggc tca gag cat atg agc gaa gag cag ttg cgg | 528 |
| | Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg | |
| | 165 170 175 | |
| 20 | caa ctg gtc acc aag gac gtg ctg atc ggc gtc gcc ctg ccc cgc gtt | 576 |
| | Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val | |
| | 180 185 190 | |
| | ggc tga gcaaggccgc ccaaccccat tcaacttccg gagtggttcaa t atg gat ggc | 632 |
| | Gly Met Asp Gly | 195 |
| 25 | ttt cac gat ctc ggc ggt ttc cag ggc ttt ggc aaa gtg ccc cac cgc | 680 |
| | Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val Pro His Arg | |
| | 200 205 210 | |
| 30 | atc aac agc ctg agc tac aag cag gtg ttc aag cag gac tgg gaa cac | 728 |
| | Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp Trp Glu His | |
| | 215 220 225 | |
| 35 | ctg gcc tac agc ctg atg ttc atc ggc gtc gac cac ctg aac aag ttc | 776 |
| | Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu Asn Lys Phe | |
| | 230 235 240 | |
| 40 | agc gtc gac gaa ata cgt cat gcc gtc gaa cgc att gac gtg cgc cag | 824 |
| | Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp Val Arg Gln | |
| | 245 250 255 260 | |
| | cac gtc ggc acc gaa tac tac gaa cgt tat gtg atc gcc act gcc acg | 872 |
| | His Val Gly Thr Glu Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala Thr Ala Thr | |
| | 265 270 275 | |
| 45 | ctg ctg gtc gaa aca ggc gtc atc acc cag gcc gaa ctg gat gaa gca | 920 |
| | Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu Asp Glu Ala | |
| | 280 285 290 | |
| 50 | ctc ggc tcg cac ttc aag ctg gcc aac ccc gcc cat gcg caa ggg cgt | 968 |
| | Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala Gln Gly Arg | |
| | 295 300 305 | |
| 55 | gct gca att atc ggg cga gcg cct ttt gaa gtg ggc gat cgg gtc atc | 1016 |
| | Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp Arg Val Ile | |
| | 310 315 320 | |
| 60 | gta cgc gat gaa tac gtg gcc ggg cat gtg cgc atg cct gca tac gtg | 1064 |
| | Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro Ala Tyr Val | |
| | 325 330 335 340 | |

| | | |
|----|--|------|
| | cgc ggc aag caa ggc gta gtg ctg cac cgg acc act gaa cag tgg ccg | 1112 |
| | Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu Gln Trp Pro | |
| | 345 350 355 | |
| 5 | ttt ccg gac gcg att ggc cat ggc gac cag agc gct gcg cat caa ccg | 1160 |
| | Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala His Gln Pro | |
| | 360 365 370 | |
| 10 | acc tac cat gtc gag ttc cgc gtg cgg gac ctg tgg ggc gat gcc gca | 1208 |
| | Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly Asp Ala Ala | |
| | 375 380 385 | |
| 15 | gac gac ggc ctg gtg gtg gta gac ctg ttc gaa agc tat ctg gac agg | 1256 |
| | Asp Asp Gly Leu Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr Leu Asp Arg | |
| | 390 395 400 | |
| 20 | gtc gaa agc ccg cga gtg gtg cgc gca tga gtgccggcgc ccaggcaggc | 1306 |
| | Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala | |
| | 405 410 | |
| | cggtctgccg tgacggtcct ttcaggcttc ctccggcgag gcaagaccac cctgctcaac | 1366 |
| | cacatcctgc gcaaccgcca gggcctgaag gtggcggtta tcgtcaatga catgagcgag | 1426 |
| 25 | gtcaacatcg atgccgccca ggtccagcgc gacgttgccg tgtatcgtgg ccaggatgaa | 1486 |
| | ttgatagaga tgagcaacgg ctgtatctgc tgcaccctgc gcgccgacct gcttgagcag | 1546 |
| 30 | atcagcgcgc tggcgcgcca gcagcgtttc gattacctgt tgatcgagtc caccgggatt | 1606 |
| | tccgagccga tgccagtcgc cgagaccttt gcctttctcg acgccaacgg tttcagcctc | 1666 |
| | agcgaaactgg cgcggctgga tacgctggtg acggtggtcg atgccagcca gttcatggcc | 1726 |
| 35 | atgctogaat ctcccgaaac cgtcgcgcgg gccgacgtca ccacggatga cagcaggcgc | 1786 |
| | ccgctggccg atctgctgat cgagcaggtc gagtatgcca atgtgattct ggtcaacaaa | 1846 |
| 40 | cgcgacctgg tcgacgaggc gcagtaccag gccctgcagg cagttctcgc cgggctcaat | 1906 |
| | ccaggcgac agatcctgcc gatgggtggc ggcaacgtcg ccctgtcgag cgtccttggt | 1966 |
| | acccagctgt tcgatttgcc cagccttgcc gcagcgcccg gctggatgaa acagatggac | 2026 |
| 45 | gcgcacgaca ccccggccgg cgagtgcgag acctatggcg tgacgtcatg ggtgtaccga | 2086 |
| | gcgcgcgcgc cgttccatcc gcaacgcttg cttgattttc tggcccgcc ctggcgcgac | 2146 |
| 50 | ggccgtcttc tgccgagcaa aggttatctc tggcttgcca gccgccaccg cgaaatcggc | 2206 |
| | ttgctggtac acagcggcca gcagtttcaa tgggactatg ttggccattg gtggaacttc | 2266 |
| | atcgacacgt cacagtggcc acaggacaag tatcgcttgc agggcatcat ggccaagtgg | 2326 |
| 55 | gacagcatcg tcggcgactg ccgacaggag ctgaaaagct tatga | 2371 |
| 60 | <210> 7 | |
| | <211> 193 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Pseudomonas putida | |

<400> 7

5 Met Thr Ala Thr Ser Thr Pro Gly Glu Arg Ala Arg Ala Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Leu Lys Arg Lys Asp Leu Ile Pro Glu Gly Tyr Ile Glu Gln Leu
 20 25 30
 10 Thr Gln Leu Met Glu His Gly Trp Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Ile
 35 40 45
 15 Val Ala Lys Ala Trp Val Asp Pro Gln Phe Arg Glu Leu Leu Leu Lys
 50 55 60
 20 Asp Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gln Phe Gly Phe Thr Gly Pro Gln Gly
 65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Val Ala Leu Glu Asp Thr Pro Gln Leu Lys Asn Val Ile
 85 90 95
 25 Val Cys Ser Leu Cys Ser Cys Thr Asn Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro
 100 105 110
 30 Pro Glu Trp Tyr Lys Gly Phe Glu Phe Arg Ala Arg Leu Val Arg Glu
 115 120 125
 35 Gly Arg Thr Val Leu Arg Glu Leu Gly Thr Glu Leu Pro Gly Asp Met
 130 135 140
 40 Val Val Lys Val Trp Asp Thr Ser Ala Glu Ser Arg Tyr Leu Val Leu
 145 150 155 160
 Pro Gln Arg Pro Ala Gly Ser Glu His Met Ser Glu Glu Gln Leu Arg
 165 170 175
 45 Gln Leu Val Thr Lys Asp Val Leu Ile Gly Val Ala Leu Pro Arg Val
 180 185 190
 50 Gly
 55 <210> 8
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas putida
 60 <400> 8

Met Asp Gly Phe His Asp Leu Gly Gly Phe Gln Gly Phe Gly Lys Val
 1 5 10 15
 5 Pro His Arg Ile Asn Ser Leu Ser Tyr Lys Gln Val Phe Lys Gln Asp
 20 25 30
 10 Trp Glu His Leu Ala Tyr Ser Leu Met Phe Ile Gly Val Asp His Leu
 35 40 45
 15 Asn Lys Phe Ser Val Asp Glu Ile Arg His Ala Val Glu Arg Ile Asp
 50 55 60
 Val Arg Gln His Val Gly Thr Glu Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Ala
 65 70 75 80
 20 Thr Ala Thr Leu Leu Val Glu Thr Gly Val Ile Thr Gln Ala Glu Leu
 85 90 95
 25 Asp Glu Ala Leu Gly Ser His Phe Lys Leu Ala Asn Pro Ala His Ala
 100 105 110
 30 Gln Gly Arg Ala Ala Ile Ile Gly Arg Ala Pro Phe Glu Val Gly Asp
 115 120 125
 35 Arg Val Ile Val Arg Asp Glu Tyr Val Ala Gly His Val Arg Met Pro
 130 135 140
 Ala Tyr Val Arg Gly Lys Gln Gly Val Val Leu His Arg Thr Thr Glu
 145 150 155 160
 40 Gln Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Asp Gln Ser Ala Ala
 165 170 175
 45 His Gln Pro Thr Tyr His Val Glu Phe Arg Val Arg Asp Leu Trp Gly
 180 185 190
 50 Asp Ala Ala Asp Asp Gly Leu Val Val Val Asp Leu Phe Glu Ser Tyr
 195 200 205
 55 Leu Asp Arg Val Glu Ser Pro Arg Val Val Arg Ala
 210 215 220
 <210> 9
 <211> 1089
 <212> DNA
 60 <213> Pseudomonas putida

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1089)
 <223> Gen der Kodierregion des Aktivatorproteins

5
 <400> 9
 atg agt gcc gcc gcc cag gca gcc cgg ctg ccg gtg acg gtc ctt tca 48
 Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser
 1 5 10 15

10
 gcc ttc ctc gcc gca gcc aag acc acc ctg ctc aac cac atc ctg cgc 96
 Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg
 20 25 30

15
 aac cgc cag gcc ctg aag gtg gcg gtt atc gtc aat gac atg agc gag 144
 Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu
 35 40 45

20
 gtc aac atc gat gcc gcc cag gtc cag cgc gac gtt gcg ctg tat cgt 192
 Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg
 50 55 60

25
 gcc cag gat gaa ttg ata gag atg agc aac gcc tgt atc tgc tgc acc 240
 Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr
 65 70 75 80

30
 ctg cgc gcc gac ctg ctt gag cag atc agc gcg ctg gcg cgc cag cag 288
 Leu Arg Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ile Ser Ala Leu Ala Arg Gln Gln
 85 90 95

35
 cgt ttc gat tac ctg ttg atc gag tcc acc ggg att tcc gag ccg atg 336
 Arg Phe Asp Tyr Leu Leu Ile Glu Ser Thr Gly Ile Ser Glu Pro Met
 100 105 110

40
 cca gtc gcc gag acc ttt gcc ttt ctc gac gcc aac ggt ttc agc ctc 384
 Pro Val Ala Glu Thr Phe Ala Phe Leu Asp Ala Asn Gly Phe Ser Leu
 115 120 125

45
 agc gaa ctg gcg cgg ctg gat acg ctg gtg acg gtg gtc gat gcc agc 432
 Ser Glu Leu Ala Arg Leu Asp Thr Leu Val Thr Val Val Asp Ala Ser
 130 135 140

50
 cag ttc atg gcc atg ctc gac tct ccc gaa acc gtc gcg cgg gcc gac 480
 Gln Phe Met Ala Met Leu Asp Ser Pro Glu Thr Val Ala Arg Ala Asp
 145 150 155 160

55
 gtc acc acg gat gac agc agg cgc ccg ctg gcc gat ctg ctg atc gag 528
 Val Thr Thr Asp Asp Ser Arg Arg Pro Leu Ala Asp Leu Leu Ile Glu
 165 170 175

60
 cag gtc gag tat gcc aat gtg att ctg gtc aac aaa cgc gac ctg gtc 576
 Gln Val Glu Tyr Ala Asn Val Ile Leu Val Asn Lys Arg Asp Leu Val
 180 185 190

65
 gac gag gcg cag tac cag gcc ctg cag gca gtt ctc gcc ggg ctc aat 624
 Asp Glu Ala Gln Tyr Gln Ala Leu Gln Ala Val Leu Ala Gly Leu Asn
 195 200 205

70
 cca gcc gca cag atc ctg ccg atg gtg gcc gcc aac gtc gcc ctg tcg 672
 Pro Gly Ala Gln Ile Leu Pro Met Val Ala Gly Asn Val Ala Leu Ser
 210 215 220

| | | |
|----|---|------|
| | agc gtc ctt ggt acc cag ctg ttc gat ttg ccc agc ctt gcc gca gcg | 720 |
| | Ser Val Leu Gly Thr Gln Leu Phe Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Ala | |
| | 225 230 235 240 | |
| 5 | ccc ggc tgg atg aaa cag atg gac gcg cac gac acc ccg gcc ggc gag | 768 |
| | Pro Gly Trp Met Lys Gln Met Asp Ala His Asp Thr Pro Ala Gly Glu | |
| | 245 250 255 | |
| 10 | tcg cag acc tat ggc gtg acg tca tgg gtg tac cga gcg cgc gcc ccg | 816 |
| | Ser Gln Thr Tyr Gly Val Thr Ser Trp Val Tyr Arg Ala Arg Ala Pro | |
| | 260 265 270 | |
| 15 | ttc cat ccg caa cgc ttg ctt gat ttt ctc gcc cgg ccc tgg cgc gac | 864 |
| | Phe His Pro Gln Arg Leu Leu Asp Phe Leu Ala Arg Pro Trp Arg Asp | |
| | 275 280 285 | |
| 20 | ggc cgt ctt ctg cgc agc aaa ggt tat ttc tgg ctt gcc agc cgc cac | 912 |
| | Gly Arg Leu Leu Arg Ser Lys Gly Tyr Phe Trp Leu Ala Ser Arg His | |
| | 290 295 300 | |
| 25 | cgc gaa atc ggc ttg ctg gta cac agc ggc cag cag ttt caa tgg gac | 960 |
| | Arg Glu Ile Gly Leu Val His Ser Gly Gln Gln Phe Gln Trp Asp | |
| | 305 310 315 320 | |
| 30 | tat gtt ggc cat tgg tgg aac ttc atc gac acg tca cag tgg cca cag | 1008 |
| | Tyr Val Gly His Trp Trp Asn Phe Ile Asp Thr Ser Gln Trp Pro Gln | |
| | 325 330 335 | |
| 35 | gac aag tat cgc ttg cag ggc atc atg gcc aag tgg gac agc atc gtc | 1056 |
| | Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val | |
| | 340 345 350 | |
| 40 | ggc gac tgc cga cag gag ctg aaa agc tta tga | 1089 |
| | Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu | |
| | 355 360 | |
| 45 | <210> 10 | |
| | <211> 362 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Pseudomonas putida | |
| | <400> 10 | |
| 50 | Met Ser Ala Gly Ala Gln Ala Gly Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser | |
| | 1 5 10 15 | |
| 55 | Gly Phe Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn His Ile Leu Arg | |
| | 20 25 30 | |
| 60 | Asn Arg Gln Gly Leu Lys Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu | |
| | 35 40 45 | |
| 65 | Val Asn Ile Asp Ala Ala Gln Val Gln Arg Asp Val Ala Leu Tyr Arg | |
| | 50 55 60 | |
| 70 | Gly Gln Asp Glu Leu Ile Glu Met Ser Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr | |
| | 65 70 75 80 | |

19

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Leu | Arg | Ala | Asp | Leu | Leu | Glu | Gln | Ile | Ser | Ala | Leu | Ala | Arg | Gln | Gln | 85 | 90 | 95 | |
| 5 | Arg | Phe | Asp | Tyr | Leu | Leu | Ile | Glu | Ser | Thr | Gly | Ile | Ser | Glu | Pro | Met | 100 | 105 | 110 | |
| 10 | Pro | Val | Ala | Glu | Thr | Phe | Ala | Phe | Leu | Asp | Ala | Asn | Gly | Phe | Ser | Leu | 115 | 120 | 125 | |
| 15 | Ser | Glu | Leu | Ala | Arg | Leu | Asp | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Val | Asp | Ala | Ser | 130 | 135 | 140 | |
| 20 | Gln | Phe | Met | Ala | Met | Leu | Asp | Ser | Pro | Glu | Thr | Val | Ala | Arg | Ala | Asp | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 25 | Val | Thr | Thr | Asp | Asp | Ser | Arg | Arg | Pro | Leu | Ala | Asp | Leu | Leu | Ile | Glu | 165 | 170 | 175 | |
| 30 | Gln | Val | Glu | Tyr | Ala | Asn | Val | Ile | Leu | Val | Asn | Lys | Arg | Asp | Leu | Val | 180 | 185 | 190 | |
| 35 | Asp | Glu | Ala | Gln | Tyr | Gln | Ala | Leu | Gln | Ala | Val | Leu | Ala | Gly | Leu | Asn | 195 | 200 | 205 | |
| 40 | Pro | Gly | Ala | Gln | Ile | Leu | Pro | Met | Val | Ala | Gly | Asn | Val | Ala | Leu | Ser | 210 | 215 | 220 | |
| 45 | Ser | Val | Leu | Gly | Thr | Gln | Leu | Phe | Asp | Leu | Pro | Ser | Leu | Ala | Ala | Ala | 225 | 230 | 235 | 240 |
| 50 | Pro | Gly | Trp | Met | Lys | Gln | Met | Asp | Ala | His | Asp | Thr | Pro | Ala | Gly | Glu | 245 | 250 | 255 | |
| 55 | Ser | Gln | Thr | Tyr | Gly | Val | Thr | Ser | Trp | Val | Tyr | Arg | Ala | Arg | Ala | Pro | 260 | 265 | 270 | |
| 60 | Phe | His | Pro | Gln | Arg | Leu | Leu | Asp | Phe | Leu | Ala | Arg | Pro | Trp | Arg | Asp | 275 | 280 | 285 | |
| | Gly | Arg | Leu | Leu | Arg | Ser | Lys | Gly | Tyr | Phe | Trp | Leu | Ala | Ser | Arg | His | 290 | 295 | 300 | |
| | Arg | Glu | Ile | Gly | Leu | Leu | Val | His | Ser | Gly | Gln | Gln | Phe | Gln | Trp | Asp | 305 | 310 | 315 | 320 |
| | Tyr | Val | Gly | His | Trp | Trp | Asn | Phe | Ile | Asp | Thr | Ser | Gln | Trp | Pro | Gln | 325 | 330 | 335 | |

Asp Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Ile Met Ala Lys Trp Asp Ser Ile Val
340 345 350

5 Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Lys Ser Leu
355 360

10 <210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Primer 1F

<400> 11
ctccaccata tgagtacagc tacttcaacg 30

20 <210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Primer 1R

<400> 12
30 cttcataagc ttctatctcg gatcaaattg 30

<210> 13
<211> 25
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer 2F

40 <400> 13
atgacggcaa cttcaacccc tgggtg 25

45 <210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Primer 2R

<400> 14
tcagctcctg tcggcagtcg 20

55